

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO
ENTRE SEIS ANTICORPOS ANTI-HER2 EM *ARRAYS*
DE CARCINOMAS MAMÁRIOS: CORRELAÇÃO COM
HIBRIDAÇÃO *IN SITU* CROMOGÊNICA E AVALIAÇÃO
INTEROBSERVADOR

CRISTIANA BUZELIN NUNES

BELO HORIZONTE

2007

N972e Nunes, Cristiana Buzelin.
Estudo imunoistoquímico comparativo entre seis anticorpos anti-her2 em *arrays* de carcinomas mamários [manuscrito] : correlação com hibridação *in situ* cromogênica e avaliação interobservador / Cristiana Buzelin Nunes. – 2007.
97 f. : il. color., tabs.
Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi.
Área de concentração: Patologia Médica.
Linha de pesquisa: Patologia Mamária.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
Bibliografia: f. 82-89.
Anexos: f. 90-97.

1. Mamas – Câncer – Teses. 2. Imunohistoquímica – Teses. 3. Neoplasias mamárias – Teses. 4. Hibridação – Teses. 5. Patologia – Teses. I. Gobbi, Helenice. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WP 870

CRISTIANA BUZELIN NUNES

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO ENTRE SEIS ANTICORPOS
ANTI-HER2 EM *ARRAYS* DE CARCINOMAS MAMÁRIOS: CORRELAÇÃO COM
HIBRIDAÇÃO *IN SITU* CROMOGÊNICA E AVALIAÇÃO INTEROBSERVADOR**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG
2007**

APOIO FINANCEIRO: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

“... quem forma se forma e re-forma ao formar e quem é formado forma-se e forma ao ser formado.”

Paulo Freire

Ao meu pai, Dr. Anísio Nunes

AGRADECIMENTOS

Meu eterno agradecimento:

À minha orientadora, Profa. Dra. Helenice Gobbi, pela oportunidade e confiança, pela amizade, dedicação, incentivo e acompanhamento constantes, e principalmente, pelo exemplo de ética e trabalho.

Ao meu marido Fernando Diniz Mendes, pela paciência, amor, apoio e compreensão.

Aos meus pais, Anísio Nunes e Eliana Buzelin Nunes pelo suporte, confiança, incentivo e principalmente pelos ensinamentos e amor na minha educação.

Aos meus irmãos, Maurício, Patrícia e Raquel, pela presença, carinho e incentivo.

À Dra. Anna Christina Lanna da Matta Machado Rodrigues, pela amizade, compreensão e equilíbrio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Mamária: Luciene Tafuri, Rafael Rocha, Vanessa Schaber, Gislene Rocha, Fernanda Sanches, Flávio Nepomuceno e Marina Alvarenga, pela amizade, convivência, momentos de alegria e pelo auxílio na parte técnica e no levantamento dos materiais.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Patologia pelos ensinamentos que foram complementares e fundamentais à minha formação e crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia pela amizade e companheirismo e momentos agradáveis que passamos juntos.

Ao Dr. Agostinho Pinto Gouvêa, pelo auxílio no material e bibliografia, pelos valiosos conselhos e pela amizade.

Ao Dr. Jorge Sérgio Reis Filho pela disponibilidade e realização do CISH.

Aos professores, residentes e funcionários do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, especialmente, Lourdinha e Ailton, pelo apoio, atenção e presença constantes.

Aos médicos e funcionários do Instituto Moacyr Junqueira e do Laboratório da Santa Casa de Belo Horizonte pela confiança e apoio.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA	gene do câncer de mama (<i>Breast cancer gene</i>)
CAP	Colégio americano de patologistas
CISH	Hibridação <i>in situ</i> cromogênica
CMF	ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
Her1	Receptor 1 do fator de crescimento epidérmico
Her2 (c-erB-b2)	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico
Her3	Receptor 3 do fator de crescimento epidérmico
Her4	Receptor 4 do fator de crescimento epidérmico
IIQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MMab	Anticorpo monoclonal de camundongo
MTTB	<i>Multi-tissue tumor block</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RabMab	Anticorpo monoclonal de coelho
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SOE	Sem outra especificação
TMA	Microarranjo de tecidos (<i>tissue microarray</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURA 1 Sistema de escore recomendado no Manual do HercepTest™ (Dako,1999): coloração de membrana.....	39
FIGURA 2 Ilustrações do guia CISH, ZYMED, 2005. (a): CISH não amplificado (1 a 5 pontos nucleares); (b), amplificado (mais de 6 pontos nucleares ou aglomerados).....	39
FIGURA 1 (artigo 1) Her2 overexpression and gene amplification in the same case of invasive breast cancer (X400). A, HercepTest; B, CB11; C, SP3; D, CISH.....	53
FIGURA 1 (artigo 2) Caso 23 corado pelos anticorpos SP3 (A) e CB11 (B), avaliado com escore 3+ por todos os observadores (400X).....	72
FIGURA 2 (artigo 2) Caso 22 corado pelo anticorpo CB11 (A) e caso 4 corado pelo HercepTest (B), ambos analisados com escores variáveis (1+, 2+ ou 3+) pelos observadores (400X).....	72
QUADRO 1 Categorias de fatores prognósticos em câncer de mama segundo a conferência de consenso de 1999 do Colégio Americano de Patologistas.....	17
QUADRO 2 Categorias prognósticas dos tipos histológicos dos carcinomas mamários invasores (segundo ELSTON & ELLIS, 1998).....	18
QUADRO 3 Sistema de graduação histológica dos tumores da mama segundo ELSTON & ELLIS, 1998*	19
QUADRO 4 Sistema de escore recomendado no Manual do HercepTest (Dako,1999): coloração de membrana.....	38

QUADRO 5 Determinação do estado do gene Her2 através do CISH proposto pela Zymed.....	38
TABELA 1 Anticorpos, fabricantes, diluições e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imunoistoquímicas.....	37
TABELA 1 (artigo 1) Antibodies clones, types, sources, dilutions and antigen retrieval methods used.....	49
TABELA 2 (artigo 1) Comparison between the Her2 overexpression using six different antibodies in 84 breast cancers.....	51
TABELA 3 (artigo 1) Semiquantitative IHC scores against amplification of <i>HER2</i> gene by CISH.....	52
TABELA 4 (artigo 1) Sensitivity and specificity of antibodies compared to CISH.....	52
TABELA 1 (artigo 2) Anticorpos, fabricantes, diluições e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imunoistoquímicas.....	70
TABELA 2 (artigo 2) Valores de Kappa da avaliação da concordância interobservador na interpretação da reação imunoistoquímica do Her2 usando cinco diferentes anticorpos analisando os resultados em três grupos.....	74

RESUMO

OBJETIVOS: Comparar o novo anticorpo monoclonal de coelho com anticorpos monoclonais de camundongo e policlonais de coelho para avaliação do Her2 empregando arrays de carcinomas mamários correlacionando os resultados com a reação de hibridação *in situ* cromogênica (CISH) e avaliar a concordância interobservador na interpretação das reações. **MATERIAL E MÉTODOS:** Cortes seqüenciais de arrays contendo 84 carcinomas mamários foram submetidos à técnica imunistoquímica empregando-se o SP3 (NeoMarkers), anticorpos policlonais de coelho HercepTest e A0485 (Dako), anticorpos monoclonais de camundongo CB11 (Novpcastra e CellMarque) e 4D5 (Genentech), e ao CISH (kit *HER2* Spot-Light® da Zymed). As reações foram realizadas em duplicata e avaliadas duplo cego empregando-se o sistema de graduação do HercepTest™ para as reações imunistoquímicas e o guia de interpretação do *HER2* da Zymed para o CISH. Para a avaliação da concordância interobservador, uma lâmina corada por cada anticorpo foi submetida à avaliação individual por cinco observadores, e os resultados separados em três análises: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 e 1+; 2+ e 3+) e III (0 e 1+; 2+; 3+), e aplicado o teste estatístico de Kappa. **RESULTADOS:** No estudo comparativo entre os anticorpos, a melhor concordância foi entre SP3 e HercepTest ($\kappa=0,74$). Os anticorpos SP3, A0485 e HercepTest detectaram todos os casos amplificados pelo CISH. Cinco casos não-amplificados (13%) receberam escore 3+ utilizando SP3, 2 casos (5,3%), utilizando HercepTest, e 10 casos (26,3%) utilizando A0485. Três casos amplificados (6,5%) foram negativos pelo CB11 e 1 caso (2,2%) foi negativo para o 4D5. A concordância interobservador foi boa quando os casos foram avaliados na análise I (0; 1+; 2+; 3+). Quando foram avaliados na análise II (0 e 1+, 2+ e 3+), a concordância interobservador foi boa nos casos corados por SP3 e CB11, e muito boa nos casos corados por A0485, HercepTest e 4D5. Na análise III (0 e 1+; 2+; 3+), foi observada concordância interobservador moderada para os casos corados pelo anticorpo CB11, e boa para os casos corados pelos outros anticorpos. **CONCLUSÕES:** O novo anticorpo SP3 é mais sensível do que os anticorpos monoclonais CB11 e 4D5 para a detecção de Her2. Os anticorpos HercepTest, CB11 e 4D5 mostram maior especificidade do que o SP3. A concordância interobservador foi considerada entre moderada e muito boa nos casos corados pelos cinco anticorpos. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos de marcação fraca (1+) e moderada (2+).

Palavras-chave: imunistoquímica, Her2, RabMab, arrays de tecido, câncer de mama, hibridação *in situ* cromogênica, concordância interobservador.

ABSTRACT

AIMS: We compared the novel rabbit monoclonal antibody SP3 with mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies using tissue microarrays (TMA) of breast carcinomas correlating the results with chromogenic *in situ* hybridization (CISH). **MATERIALS AND METHODS:** Serial sections from TMAs containing 84 breast carcinomas were submitted to CISH (Zymed *HER2* Spot-Light® kit) and immunohistochemistry, using SP3 (NeoMarkers), rabbit polyclonal antibodies A0485 and HercepTest (Dako), mouse monoclonal antibodies CB11 (Novocastra and CellMarque), and 4D5 (Genentech). All tests were performed in duplicate and sections were double-blindly evaluated using the HercepTest™ scoring system and Zymed *HER2* interpretation guide for CISH. For the interobserver agreement evaluation, one slide from each antibody was independently scored by five observers and results evaluated considering three analysis: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 and 1+; 2+ and 3+) and III (0 and 1+; 2+; 3+). Kappa statistics was applied for data analysis. **RESULTS:** From antibodies comparison, the best concordance was observed between SP3 and HercepTest (kappa=0.74). SP3, A0485, and HercepTest detected all *HER2* amplified cases. There were 5 non-amplified cases (13%) scored as 3+ using SP3, 2 cases (5.3%) using HercepTest, and 10 (26.3%) cases using A0485. Three amplified cases (6.5%) were negative for CB11 and 1 case (2.2%) was negative for 4D5. There was a good rate of interobserver agreement when four scores were considered (0; 1+; 2+; 3+). When the scores were considered in two categories (0 and 1+; 2+ and 3+), a substantial rate of interobserver agreement was considered for cases stained for SP3 and CB11, and almost perfect for cases stained for A0485, HercepTest and 4D5. For analysis III (0 and 1+; 2+; 3+), a moderate rate of interobserver agreement was considered for cases stained for CB11, and a substantial rate for other antibodies. **CONCLUSIONS:** The novel SP3 is more sensitive than monoclonal antibodies CB11 and 4D5 for Her2 assessment. However, HercepTest, CB11 and 4D5 show higher specificity than SP3. The overall interobserver agreement was considered moderate to substantial in the evaluation of cases stained for the five antibodies. The lowest rate of agreement was obtained in the evaluation of cases scored as weak (1+) and moderate (2+).

Keywords: immunohistochemistry, Her2, RabMab, tissue microarrays, breast cancer , Chromogenic *in situ* hybridization, interobserver agreement.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Câncer de mama.....	14
1.2 Fatores prognósticos e preditivos do carcinoma mamário.....	15
1.2.1 Fatores clínicos.....	15
1.2.2 Fatores morfológicos e moleculares.....	16
1.3 Her2.....	20
1.3.1 Her2 e imunohistoquímica.....	23
1.3.2 <i>HER2</i> e hibridação <i>in situ</i>	26
1.3.3 Her2 e variação interobservador.....	27
1.4 Microarranjo de tecidos (<i>tissue microarray</i>, TMA).....	29
1.4.1 Construção do TMA.....	30
1.4.2 TMA e câncer de mama.....	32
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Artigo 1 - The novel rabbit monoclonal antibody against Her2: an immunohistochemical and CISH comparative analysis in breast cancer	41

4.2 Artigo 2 - Concordância interobservador na interpretação imunoistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em <i>arrays</i> de carcinomas mamários.....	61
5 CONCLUSÕES	79
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS.....	90

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tumor maligno mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e pelos efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade feminina e a própria imagem pessoal. É uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais e as estatísticas indicam aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. O avanço nos métodos de detecção, através de imagem tem permitido seu diagnóstico precoce e uma intervenção terapêutica progressivamente menos mutiladora. Em alguns lugares do mundo (América do Norte, Europa Ocidental e Austrália), a mortalidade por câncer de mama está começando a diminuir, provavelmente devido à ação combinada de diagnóstico precoce e terapias adjuvantes mais eficazes (JATOI & MILLER, 2003; VERONESI *et al*, 2006).

No Brasil, o câncer de mama é o segundo câncer mais incidente em mulheres, e a maior causa de morte em mulheres por câncer, com 48.930 casos estimados para 2006, segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil do Instituto Nacional do Câncer (INCA BRASIL, 2006). A mortalidade por câncer de mama depende de fatores do tumor e do paciente que interferem na sua evolução (SHAIRER, 2004).

Consideram-se fatores prognósticos em câncer de mama as características clínicas das pacientes e os aspectos patológicos e biológicos dos tumores que permitem prever a evolução clínica da doença ou sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico inicial. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas que são utilizadas para estimar a probabilidade de resposta

a um tipo particular de terapia adjuvante, por exemplo: a pesquisa de receptores de estrógeno determinando a terapêutica hormonal adjuvante (ALLRED *et al.*, 1998). Vários marcadores prognósticos têm também valor preditivo. Um marcador prognóstico para ter validade deve ser validado tecnicamente, ter significado estatístico validado por testes clínicos e influenciar na decisão clínica. (ALLRED *et al.*, 1998; FITZGIBBONS *et al.*, 2000; SCHMITT, 1999).

1.2 - FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CARCINOMA MAMÁRIO

1.2.1 - FATORES CLÍNICOS:

a) Idade

O fator idade tem sido considerado indicador de prognóstico adverso. Mulheres jovens (idade igual ou inferior a 35 anos) mostram tumores com grau histológico mais elevado, metástases axilares mais frequentes, elevado índice proliferativo e maior angiogênese tumoral. Além disso, há maior risco de recidiva e metástase à distância. (McPHERSON *et al.*, 2000).

b) Status do gene BRCA1

Carcinoma de mama em mulheres com mutação do gene BRCA1 estão associados com pior índice de sobrevida se não receberem terapia adjuvante (GOFFIN *et al.*, 2003).

c) Gravidez

O carcinoma de mama diagnosticado na gravidez ou lactação está associado com prognóstico desfavorável. Entretanto, não se sabe se este prognóstico mais agressivo relaciona-se com a gestação em si ou com outros fatores como a idade da paciente e diagnóstico em estágios mais avançados na gravidez (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003).

d) Diagnóstico precoce

Os tumores diagnosticados precocemente através de mamografia geralmente são menores do que os detectados clinicamente, não apresentam metástases axilares, e incluem uma frequência maior de subtipos histologicamente mais favoráveis (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003).

.

1.2.2 - FATORES MORFOLÓGICOS E MOLECULARES:

Em 1999 uma reunião de consenso no Colégio Americano de Patologistas (CAP) estratificou os fatores prognósticos do câncer de mama em três categorias especificadas no Quadro 1 (FITZGIBBONS, *et al.*, 2000). A categoria I inclui os fatores já validados como importantes no prognóstico e úteis na conduta clínica dos pacientes. Na categoria II foram englobados os fatores prognósticos que têm sido intensamente estudados do ponto de vista da biologia e da clínica, mas que ainda precisam ser validados em estudos estatísticos consistentes. A categoria III inclui todos os outros fatores ainda não suficientemente estudados para demonstrar seu valor prognóstico.

O tipo e grau histológicos dos tumores têm seu valor bem estabelecido e foram incluídos na categoria I do CAP. Estudos de longos seguimentos mostram que alguns tipos especiais cursam com melhor prognóstico (por exemplo: tubular, cribriforme) enquanto outros indicam prognóstico desfavorável (por exemplo: ductal SOE, apócrino) (PAGE *et al.*, 1998). As categorias prognósticas dos tipos histológicos dos carcinomas mamários invasores encontram-se listadas no Quadro 2. Elston e Ellis (1991) propuseram uma classificação prognóstica dos carcinomas de mama (Quadro 3).

QUADRO 1 – Categorias de fatores prognósticos em câncer de mama segundo a conferência de consenso de 1999 do Colégio Americano de Patologistas

Categoria	Fatores prognósticos
I	Estadiamento (TNM)
	Grau histológico
	Tipo histológico
	Número de mitoses
	Receptores hormonais
II	HER-2/neu (c-erbB-2)
	p53
	Invasão vascular linfática ou sangüínea
	Marcadores de proliferação celular: MIB-1
	Análise de DNA: fração de fase S
III	Análise de ploidia de DNA
	Angiogênese tumoral
	EGFR
	TGF- α
	bcl-2
	PS2
Catepsina D	

FITZGIBBONS, *et al.*, 2000.

QUADRO 2 – Categorias prognósticas dos tipos histológicos dos carcinomas mamários invasores (segundo ELSTON & ELLIS, 1998)

Categorias prognósticas	Tipos histológicos
Tumores de prognóstico excelente	Carcinoma tubular
	Carcinoma cribriforme
	Carcinoma mucinoso (colóide)
	Carcinoma túbulo-lobular
Tumores de prognóstico bom	Carcinoma lobular clássico
	Carcinoma variante mucinoso
Tumores de prognóstico intermediário	Carcinoma medular
	Carcinoma variante lobular
	Carcinoma variante medular
Tumores de prognóstico desfavorável	Carcinoma micropapilar
	Carcinoma apócrino
	Carcinoma ductal SOE

QUADRO 3 – Sistema de graduação histológica dos tumores da mama segundo ELSTON & ELLIS, 1991*

Formação tubular	Pontuação 1: > 75% da área tumoral
	Pontuação 2: entre 10-75% da área tumoral
	Pontuação 3: < 10% da área tumoral
Atipia nuclear	Pontuação 1: tamanho nuclear semelhante à célula ductal normal (2-3 vezes o tamanho de uma hemácia)
	Pontuação 2: núcleos de tamanho intermediário
	Pontuação 3: núcleos grandes e pleomórficos, geralmente com nucléolos proeminentes
Índice mitótico **	Pontuação 1: 1 mitose por campo de grande aumento
	Pontuação 2: 2 mitoses por campo de grande aumento
	Pontuação 3: 3 ou mais mitoses por campo de grande aumento

*Modificado da classificação de BLOOM & RICHARDSON (1957)

**Para microscópios com objetivas de grande aumento em que o campo visual possua um diâmetro de 0,48mm, o índice mitótico deve ser corrigido como a seguir (ELSTON & ELLIS, 1998).

1. Até 6 mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento
2. 7-12 mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento
3. Mais de 12 mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento

O grau histológico pode também ter valor preditivo no que diz respeito à resposta à quimioterapia. Tumores de alto grau em geral apresentam melhor resposta a determinados quimioterápicos quando comparados com tumores de baixo grau histológico (PINDER *et al.*, 1998).

Até o momento, os únicos fatores preditivos avaliados por imunohistoquímica e amplamente validados para uso clínico rotineiro são os receptores hormonais para estrógeno (RE) e progesterona (RP) (FITZGGIBONS *et al.*, 2000; TAVASSOLI & DEVILEE, 2003). Nos últimos anos, o Her2 tem ganhado importância progressiva como fator preditivo de resposta ao Trastuzumab. No entanto, sua pesquisa através de IHC ainda tem controvérsias e será discutido a seguir.

1.3 – Her2

O proto-oncogene *HER-2/neu* é o análogo humano do gene *neu* identificado em neuroblastomas de camundongos, no início da década de 80, e é conhecido como *neu*, *HER2*, e *c-erbB-2*. Ele está localizado na banda q21 do cromossoma 17 e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185kD. Esta proteína possui uma seqüência de aminoácidos com atividade tirosinoquinase intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico e atua como um receptor de fatores de crescimento. Ela é um membro da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), a qual inclui o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR/Her1), Her2, Her3 e Her4. A ligação de um fator de crescimento a um dos receptores da família resulta na formação de dímeros (hetero ou homodímeros). A dimerização é seguida de fosforilação do domínio intracelular do receptor, dando

origem a uma cascata de transdução de sinais e consequente ativação do gene, o qual tem importante função no crescimento celular e manutenção do estado de transformação das células. Além disso, ele está envolvido na diferenciação, adesão e motilidade celular, tendo sido demonstrada correlação entre a amplificação do *HER2* e agressividade biológica nos carcinomas mamários. Embora a proteína Her2 forme heterodímeros com outros membros da família após ligação dos mesmos aos fatores de crescimento, não existe nenhum ligante conhecido para o Her2, que é considerado um receptor órfão. Quando superexpresso, o Her2 pode sofrer homodimerização espontânea, fato que pode ser clinicamente relevante nos tumores com superexpressão desta proteína de superfície (SCHNITT, 2001; STERN, 2000).

A superexpressão protéica de Her2 na mama tem sido relatada em 40-60% dos carcinomas intraductais e em 20-30% dos carcinomas invasores (variando de 5-55%, média de 26%). Nos carcinomas mamários, a superexpressão protéica está associada à amplificação gênica em 90% dos casos (BÁNKFALVI, *et al.*, 2000).

Nos trabalhos pioneiros de Slamon *et al.* (1987), o Her2 foi apontado como fator prognóstico independente no câncer de mama, mas estudos posteriores mostraram a sua associação com outros fatores prognósticos, entre eles comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, alto grau histológico, elevado índice proliferativo e ausência de expressão de receptores hormonais, mostrando sua importância prognóstica em análise univariada, mas que perde seu significado em análise multivariada. Entretanto, a superexpressão do Her2 continua sendo associada a tumores de comportamento biológico agressivo, principalmente em pacientes com carcinoma de mama linfonodo-positivo (GOBBI *et al.*, 2000; SCHNITT, 2001). No

entanto, em pacientes linfonodo negativo esta associação ainda é pouco definida (GOUVEA *et al.*, 2006). Estudos que associam achados histológicos e superexpressão do Her2 mostram maior correlação de superexpressão de Her2 com carcinomas ductais invasores SOE grau histológico III. Carcinomas lobulares invasores, carcinomas de tipos especiais e carcinoma ductal invasor SOE grau histológico I apresentam superexpressão de Her2 em cerca de 1,4% dos casos (LOPEZ-GUERREIRO *et al.*, 2003).

Há evidências consistentes de que a superexpressão do Her2 seja preditiva de sensibilidade a antraciclinas. Tumores que superexpressam Her2 são menos responsivos à ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil (CMF) e ao tamoxifeno do que tumores sem superexpressão do Her2 (MILES, 2001; PICCART *et al.*, 2000). A substituição do tamoxifeno por inibidores da aromatase em pacientes Her2 e receptor de estrógeno positivos tem mostrado resultados clínicos mais promissores (OSBORNE *et al.*, 2003).

Recentemente, a detecção do Her2 se tornou ainda mais importante após a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) do Trastuzumab (Herceptin®, Genentech Corporation, EUA), que associado à quimioterapia, pode diminuir a progressão tumoral do carcinoma mamário invasor (MILES *et al.*, 2001; PRITCHARD *et al.*, 2006). Existe uma crescente demanda clínica para detecção precisa do status do Her2 em carcinomas mamários invasores. Apesar de existir uma variedade de métodos diferentes para detectar o status do Her2, os dois testes mais utilizados na prática de rotina são a imunistoquímica (IIQ) para detecção de superexpressão protéica e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) ou cromogênica (CISH) para

detecção de amplificação gênica (ROSS & FLETCHER, 1999). Existem atualmente três testes aprovados pelo FDA para avaliação do Her2 com finalidade clínica: HercepTest™(Dako), PathVysion™(Vysis) e Inform™(Oncor/Ventana). Entretanto, nenhum teste foi aprovado para todos os propósitos clínicos (acesso prognóstico, resposta preditiva à quimioterapia e determinação de adequabilidade ao tratamento com Herceptin).

Os primeiros estudos do Her2 utilizavam as técnicas de *Southern* e *Western blotting* para detecção de amplificação gênica e superexpressão protéica. Estes métodos não são adequados para rotina diagnóstica e foram substituídos pela IIQ e pelo FISH (JACOBS *et al.*, 1999). A determinação de amplificação do *HER2* através de *real-time* PCR tem sido comparada ao FISH e à IIQ, mostrando tratar-se de método sensível e específico, com resultados comparáveis ao FISH, e potencial de categorizar os tumores com superexpressão duvidosa à IIQ (BENOHR *et al.*, 2005; NISTOR *et al.*, 2006). Já a dosagem sérica da concentração de Her2 não pode substituir a IIQ ou o FISH para avaliar Her2. Também não pode ser usada como marcador tumoral em câncer de mama primário, devido à baixa prevalência da elevação de Her2 sérico (KONG *et al.*, 2006).

1.3.1 – Her2 E IMUNOISTOQUÍMICA (IIQ)

A reação de imunistoquímica continua sendo o teste de rotina mais atrativo para a avaliação do Her2, devido ao menor custo, facilidade técnica e relevância biológica. A IIQ detecta a superexpressão protéica do Her2 localizada na membrana citoplasmática da célula tumoral. Problemas com a variabilidade da coloração

imunoistoquímica têm sido reportados, especialmente diferenças na sensibilidade e especificidade entre os vários anticorpos comerciais disponíveis, variação da interpretação das reações e artefatos de técnica (HANNA *et al.*, 1999).

A técnica imunoistoquímica envolve as etapas pré-analítica (como preparar o tecido), analítica (fases técnicas do ensaio imunoistoquímico) e pós-analítica (interpretação e quantificação dos resultados). Todas as etapas são importantes e ainda há grande variação nas metodologias empregadas pelos diferentes laboratórios. Como resultado, a padronização do método é variável. Trabalhos europeus e americanos mostram grande variação nos resultados da avaliação do Her2. Os problemas relacionados à fase analítica ou de processamento da reação são os principais responsáveis por baixas avaliações nos programas externos de controle de qualidade (HAMMOND, *et al.*, 2003; RHODES, *et al.*, 2002; SEIDAL *et al.*, 2001; WICK *et al.*, 2002). A escolha do anticorpo primário é um dos fatores importantes nesta etapa. Embora amplamente empregados na rotina clínica e em estudos randomizados, ainda não há uma recomendação na literatura ou definição por comitês de consenso ou associações de especialistas quais os anticorpos seriam mais específicos e sensíveis para avaliação do Her2 (BILOUS, *et al.* 2003; GOUVÊA, 2003). No entanto, a escolha dos anticorpos primários tem importância fundamental no resultado final dos testes imunoistoquímicos que poderão influenciar resultados de ensaios clínicos para testes de medicamentos, ou influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente, individualmente.

Nos últimos trinta anos, houve um interesse crescente em anticorpos monoclonais de camundongos (MMabs) em relação aos anticorpos policlonais pelas suas

propriedades de uniformidade, purificação e disponibilidade. Já os anticorpos policlonais são direcionados contra diferentes epítomos ou seqüências diferentes de aminoácidos de um epítomo de um dado antígeno, levando a uma maior afinidade que os MMabs. Entre diversos animais, os coelhos são conhecidos por produzirem altos títulos de anticorpos com alta afinidade. Na teoria, anticorpos monoclonais de coelho (RabMabs) combinariam as melhores propriedades dos MMabs e os atributos mais desejáveis dos anticorpos de coelhos, havendo uma busca de diversos grupos em gerar RabMabs (ROSSI *et al.*, 2005).

Atualmente, os anticorpos mais empregados para avaliação imunoistoquímica do Her2 são os anticorpos policlonais de coelho HercepTest™ e A0485, e os anticorpos monoclonais de camundongo (MMabs) CB-11 e Tab250, sendo estes últimos considerados mais específicos e com melhor correlação com a amplificação gênica pela técnica do FISH (GOUVÊA, *et al.*, 2004, GOUVÊA, *et al.*, 2006; SAPINO *et al.*, 2003; THOMSON *et al.*, 2001; TSUDA *et al.*, 2002). Mais recentemente, surgiu uma nova geração de anticorpos monoclonais produzidos em coelhos (RabMabs). Segundo os fabricantes os RabMabs poderiam potencialmente substituir os MMabs clássicos pela alta afinidade, sensibilidade e especificidade. Além disso, eles podem ser usados com maior diluição e podem dispensar a etapa de reativação antigênica, levando a menor custo de cada teste e otimizando os tempos de reação (ROSSI *et al.* 2005; HUANG *et al.*, 2005).

1.3.2 – *HER2* E HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Embora ainda não esteja definido qual é o teste padrão-ouro (“gold standard”) para o Her2, a amplificação gênica pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) tem mostrado boa correlação com a superexpressão protéica demonstrada pela IIQ, mas é uma técnica de custo elevado, e requer equipamento e técnica especializados. A hibridação *in situ* cromogênica (CISH) do oncogene *HER2* é um método de hibridação *in situ* desenvolvido recentemente que utiliza um *probe* com sequência única de DNA marcada com digoxigenina, e incubações seqüenciais com fluoresceína antidigoxigenina, peroxidase antilfluoresceína e diaminobenzidina. O CISH, aprovado pela *European Commission*, apresenta as vantagens técnicas da IIQ com a reprodutibilidade do FISH, possui alta concordância com o FISH e custo inferior ao FISH. A interpretação do CISH é feita em microscópio óptico de luz comum, é mais rápida do que no FISH e permite avaliação simultânea das cópias genéticas, células tumorais e morfologia do tecido estudado na mesma lâmina, que é contracorada com hematoxilina. As lâminas coradas pelo CISH podem ainda ser arquivadas em arquivos usuais e o produto da reação é permanente. (ARNOULD *et al.*, 2003; BHARGAVA *et al.*, 2005; BILOUS *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2003; LORING *et al.*, 2005; PENAULT-LLORCA & CAYRE, 2004; TANNER *et al.*, 2000). Uma grande vantagem do CISH e da IIQ como tecnologia *in situ* é a habilidade de combinar diagnóstico molecular com exame histológico no mesmo tecido, diferenciando carcinoma invasor de não invasor. Uma estratégia combinatória utilizando IIQ e CISH forneceria informação compreensível e válida sobre a concentração da proteína e a amplificação do gene *HER2* para auxiliar decisões clínicas (ZHAO *et al.*, 2002).

Os estudos comparativos entre CISH e FISH mostram ser o CISH uma alternativa ao FISH como teste secundário para esclarecer os casos 2+ à IIQ. Estudos de avaliação interobservador mostram alta reprodutibilidade na interpretação dos resultados com CISH. E ainda, devido à facilidade técnica e custo relativamente baixo da reação, o uso combinado de IIQ e CISH deve ser considerado ao invés de FISH no rastreamento primário da amplificação do oncogene Her2 (GONG *et al.*, 2005; HANNA *et al.*, 2006; TANNER *et al.*, 2000). O CISH também é uma técnica útil na determinação do status do oncogene *HER2* em material de citologia (LIN *et al.*, 2005; SARTELET *et al.*, 2006).

1.3.3 – Her2 E VARIAÇÃO INTEROBSERVADOR

Através da imunohistoquímica a expressão da proteína Her2 na membrana é avaliada de forma semiquantitativa (escala de 4 pontos), levando a uma variação na interpretação do status do Her2. Esta pode estar relacionada a fatores múltiplos pré-analíticos e analíticos como tempo de fixação, anticorpo primário e metodologia utilizados, e variação interobservador na graduação das lâminas coradas. Mesmo para um patologista treinado, a distinção nítida entre categorias nominais é difícil e geralmente arbitrária, sendo demonstrada uma falta de reprodutibilidade significativa na determinação clínica da expressão do Her2, principalmente das categorias intermediárias (1+ e 2+) (PAIK *et al.*, 2002).

A IIQ para Her2 é um bom teste para rastreamento inicial dos casos extremos de superexpressão, ou seja, 0 e 3+. Os resultados iniciais 1+ e 2+ podem sofrer com variabilidade interobservador, além de possível discordância com o FISH ou CISH. A

técnica FISH deveria ser indicada nos casos classificados como 2+ pela IIQ antes de se recomendar a terapia anti-Her2 (trastuzumab). (CARLSON *et al.*, 2006; DOLAN & SNOVER, 2005; DOWSETT, *et al.*, 2003; GOUVÊA, 2003; GOUVÊA *et al.*, 2006; LAN *et al.*, 2005).

THOMSON *et al.* (2001) analisaram a variação interobservador na graduação das reações IIQ para Her2 utilizando critérios bem definidos. Observaram que a variação interobservador foi atribuída à heterogeneidade da coloração, artefatos de borda, artefatos de retração do estroma, coloração inespecífica do epitélio e estroma, coloração citoplasmática, colorações pseudomembranasas e os erros de observação. Outros autores mostraram que a análise utilizando imagens digitalizadas pode diminuir a variação interobservador (BLOOM & HARRINGTON, 2004; HATANAKA, *et al.*, 2001). Há ainda equipamentos automatizados disponíveis comercialmente, desenvolvidos para a leitura da reação IIQ do Her2, com a intenção de reduzir a variação interobservador e aumentar a correlação com o FISH (WANG, *et al.*, 2001). No entanto, a análise automatizada não distingue a positividade entre os componentes *in situ* e invasor.

A variação das técnicas empregadas pelos laboratórios também é importante. A utilização de anticorpos mono e policlonais diferentes, protocolos de reativação antigênica e de amplificação das reações de IIQ diferentes, associados à não uniformidade na interpretação dos resultados geram grande variabilidade nos resultados entre vários laboratórios (PRESS *et al.*, 2005).

1.4 - MICROARRANJO DE TECIDOS (*TISSUE MICROARRAY*, TMA)

O advento de estudos moleculares baseados no genoma de doenças levou à identificação de centenas de moléculas potencialmente associadas com o processo de doença. Surgiu então, a necessidade de analisar melhor estas moléculas em amostras de tecido para elucidar sua importância como biomarcadores ou alvos fisiológicos de prevenção baseados em drogas ou tratamentos específicos. O TMA tem sido considerado uma etapa necessária à consolidação do conhecimento adquirido através do mapeamento genético dos estudos realizados com a técnica de “cDNA Microarrays”. Esta técnica determina quais as dezenas ou centenas de genes estão superexpressos ou hipoexpressos em um tumor e que poderiam ser responsabilizados por alguma particularidade biológica, tais como o rápido crescimento, o potencial de recorrência local ou de metástase à distância, ou ainda, resistência à quimioterapia (SAUTER *et al.*, 2002).

A técnica de *tissue microarray* (TMA) permite a análise retrospectiva em larga escala da expressão protéica dos tumores através da imunistoquímica, sendo possível conhecer a expressão de uma determinada proteína em até 1000 casos diferentes em apenas uma lâmina histológica. O TMA apresenta acurácia comprovada que justifica seu emprego com amplas vantagens de custo e tempo para os estudos retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (BUBENDORF, *et al.*, 2001; MILANES – YEARSLEY, *et al.*, 2002; SAPINO *et al.*, 2006).

Em 1986, Battifora *et al.* desenvolveram a técnica do *sausage ou multi-tissue tumor block* (MTTB), onde tecidos diferentes eram processados juntos em um mesmo bloco de parafina de modo aleatório e não ordenado. Esses blocos eram utilizados para teste de novos anticorpos e como controle de qualidade das reações imunohistoquímicas. Kononen *et al.* (1998), aprimoraram a técnica de Battifora: cilindros de amostras eram retiradas de tecidos de blocos de parafina pré-existentes e reembebidos em um novo bloco de forma ordenada, com coordenadas pré-estabelecidas, tamanhos e formas regulares. Havia um maior número e melhor preservação das amostras e dos blocos, permitindo o estudo de um grande número de casos analisando-se apenas uma ou poucas lâminas. Essa técnica adicionou a vantagem de todas as amostras serem processadas em um mesmo momento e em condições idênticas. Ainda, preserva o material remanescente para outras pesquisas ou necessidades diagnósticas.

1.4.1- CONSTRUÇÃO DO TMA

Para a construção do TMA o patologista estuda as lâminas originais e seleciona as áreas de interesse que representem o tumor. A seguir as áreas selecionadas são identificadas nos blocos de parafina arquivados (bloco doador) e um cilindro de tecido (que pode variar de 0,6mm a 2,0mm de diâmetro e 3 a 4 mm de comprimento) é retirado desta área com uma agulha acoplada a um equipamento de precisão. Este cilindro é então introduzido em um novo bloco (bloco receptor), previamente preparado com orifícios cilíndricos vazios. Os cilindros dos vários casos são sucessivamente adicionados ao bloco receptor, manualmente ou com a ajuda de aparelhos específicos, e a posição de cada caso é identificada em uma planilha com

referências de coluna e linha (eixos X e Y). Ao fim, obtém-se um bloco receptor que pode conter até 1000 amostras diferentes. Deste bloco são obtidos cortes histológicos seqüenciais numerados em lâminas tratadas com adesivo que permitem a realização de reações IIQ, FISH ou CISH. É importante registrar o conjunto de fatores histológicos relevantes e, eventualmente, prognósticos dos tumores selecionados (idade do paciente, grau e diferenciação histológicos, grau nuclear, margens, invasão vascular, etc.) e reclassificar as doenças quando necessário. Este deve ser feito em arquivo ou planilha permanente para armazenar todas as informações referentes a cada um dos cilindros que irão compor o TMA, com suas coordenadas X e Y no bloco receptor (TROTER, DEMETRICK & CIEZAR, 2002).

A leitura das lâminas dos TMA pode ser feita em microscopia óptica convencional pelo patologista, seguindo a planilha previamente preparada com as coordenadas X e Y, anotando os resultados encontrados em papel ou diretamente na base de dados do computador. Vários grupos desenvolveram métodos de arquivo digital de imagens com softwares de captura de imagens, interpretação e armazenamento automatizado dos dados, permitindo rápida correlação entre os dados armazenados previamente e os resultados obtidos, revisão das imagens, quando necessário, estudos comparativos de reprodutibilidade, etc. (LIU *et al.*, 2002; MANLEY *et al.*, 2001).

1.4.2 – TMA E CÂNCER DE MAMA

Os estudos para validação do método TMA no carcinoma da mama demonstraram ser possível atingir 98% de concordância com as reações nos cortes histológicos usuais para marcadores imunoistoquímicos como o receptor de estrógeno e Her2, utilizando-se três amostras de 0,6mm de diâmetro de cada caso. Quando se utilizaram apenas duas amostras a concordância obtida foi de 94% (CAMP *et al.*, 2000; DE MARZO & FEDOR, 2004). Apesar da amostragem de mais de uma área nos carcinomas de mama ser importante para que nos TMA esteja representada toda a heterogeneidade destes tumores, estudos recentes mostraram alta concordância entre uma amostra de 0,6mm ou 2,0mm e os cortes habituais do bloco doador, e que a heterogeneidade intratumoral não altera o status do Her2 utilizando as técnicas IIQ, CISH e FISH (HENRIKSEN *et al.*, 2006; LORING *et al.*, 2005; SELVARAJAN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2003).

Atualmente o TMA tem sido amplamente utilizado para testes de validação diagnóstica interlaboratoriais, principalmente FISH, CISH E IIQ para a detecção do status do Her2 em grande número de casos, com padronização de protocolos das reações (DIAZ *et al.*, 2004; KAV *et al.*, 2004; SAEZ *et al.*, 2006) e para estudos comparativos entre testes diagnósticos diferentes para amplificação gênica e superexpressão protéica do Her2 (ZHANG *et al.*, 2003).

Há ainda descrição de equipamentos alternativos para construção de TMA empregando mini-retílicas ou outros equipamentos com bons resultados para avaliação de fatores prognósticos em câncer de mama (DATTA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2006)

A partir desta revisão da literatura abordando o Her2 como fator preditivo no câncer de mama, as diferentes formas de avaliar a superexpressão protéica e amplificação gênica, e dando continuidade à linha de pesquisa do Laboratório de Patologia Mamária da FM-UFMG, formulamos as seguintes perguntas:

1. O novo anticorpo anti-Her2 SP3 é mais sensível do que os anticorpos mono e policlonais já conhecidos e utilizados na rotina dos laboratórios de imunohistoquímica?
2. Qual anticorpo anti-Her2 utilizado na imunohistoquímica tem a melhor correlação com a amplificação gênica detectada pelo CISH?
3. Qual a variação interobservador na interpretação das reações imunohistoquímicas para os anticorpos anti-Her2?

2 - OBJETIVOS

1. Comparar através de IIQ o novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 com anticorpos policlonais e monoclonais de camundongo para a avaliação do Her2, empregando *arrays* de tecido de amostras de carcinomas mamários;
2. Relacionar a superexpressão do Her2 empregando diferentes anticorpos anti-Her2 com a amplificação gênica detectada através da hibridação *in situ* cromogênica;
3. Analisar a variação interobservador na interpretação das reações IIQ em um subgrupo de casos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 100 casos de carcinomas de mama analisados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG de 1987 a 2005. Todos os casos foram revisados quanto ao diagnóstico e graduação histológicos empregando critérios propostos pelo Colégio Americano de Patologistas (1999), PAGE *et al.* (1998) e ELSTON & ELLIS (1991). Casos com artefatos de fixação, autólise, necrose extensa e *core biopsies* foram excluídos.

Duas áreas representativas e distintas de cada carcinoma foram marcadas nos blocos de parafina (blocos doadores). Cilindros de 2,0mm de diâmetro foram retirados para a confecção do bloco receptor e montagem dos *arrays* de tecidos. Foram construídos quatro blocos de *arrays* contendo 55 cilindros de tumores mamários cada. Três cilindros de rim ou fígado também foram incluídos para servirem como iniciadores da leitura. Para a construção dos *arrays* foi empregado um equipamento alternativo, não comercial, previamente validado para este fim em nosso laboratório (ROCHA *et al.*, 2006).

Cada bloco de *array* foi submetido a cortes histológicos de 4µm, utilizando-se lâminas silanizadas, que foram numeradas seqüencialmente, corando-se a primeira e a última pela hematoxilina e eosina. As lâminas dos intervalos foram submetidas às técnicas de IIQ e CISH em duplicata. O método imunistoquímico empregado foi o da estreptavidina-biotina peroxidase (Biogenex), seguindo o protocolo do Laboratório de Patologia Mamária da UFMG (Anexo 1) e o protocolo do HercepTest (Anexo 2), empregando-se anticorpos anti-Her2. Os clones, fabricantes, diluições e

tipo de recuperação antigênica empregados encontram-se listados na Tabela 1. A revelação foi feita com cromógeno diaminobenzidina (liquid DAB - Dako) e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Duas lâminas de cada *array* foram também submetidas ao CISH, empregando-se o kit CISH™ de HER2 SP•T-Light® da Zymed (EUA).

As reações IIQ e CISH foram inicialmente avaliadas manualmente, duplo cego, por um mesmo patologista (CBN). A IIQ foi interpretada pelo sistema de escore do HercepTest (Quadro 4, Tabela 1) e o CISH, pelo guia de interpretação da Zymed (Quadro 5, Tabela 2), sendo a baixa amplificação e a alta amplificação interpretados em um único grupo chamado de amplificação presente. Os resultados da análise imunohistoquímica foram comparados ao CISH.

Após a análise inicial, uma lâmina de *array* corada pela IIQ representativa de cada anticorpo foi revista por um segundo observador com experiência na interpretação IIQ do Her2 (HG) sem o conhecimento da leitura inicial feita pelo 1º observador. As lâminas foram então reavaliadas simultaneamente pelas duas observadoras (CBN e HG) em um microscópio de dupla observação chegando-se a uma leitura consensual que foi utilizada como “padrão ouro” na etapa seguinte da análise interobservador. Estas lâminas de *array* representativas de cada anticorpo, exceto CB11 (Cell Marque) foram então distribuídas e avaliadas por cinco diferentes observadores (VFZ, APG, LSAT, HG) para análise da variação interobservador (total=5 lâminas).

TABELA 1 – Anticorpos, fabricantes, diluições e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imunoistoquímicas

Anticorpo	Tipo de Anticorpo	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
SP3	Monoclonal, coelho	NeoMarkers	1:300	Citrato pH6,0 por 25' em panela a vapor a 98°C
HercepTest	Policlonal, coelho	Dako	Pronto para uso	Citrato pH6,0 por 40' em banho-maria a 98°C
A0485	Policlonal, coelho	Dako	1:750	Citrato pH6,0 por 25' em panela a vapor a 98°C
CB11	Monoclonal, camundongo	Novocastra	1:80	Não realizada
CB11	Monoclonal, camundongo	Cell Marque	Pronto para uso	Citrato pH6,0 por 25' em panela a vapor a 95°C
4D5	Monoclonal, camundongo	Genentech	1:250	Tripsina por 5'

QUADRO 4 - Sistema de escore recomendado no Manual do HercepTest™ (Dako,1999): coloração de membrana

Grau de interpretação	Achado microscópico
0 NEGATIVO	Não identificada nenhuma coloração na membrana citoplasmática
1+ NEGATIVO	Coloração fraca envolvendo parcialmente a circunferência da membrana citoplasmática em pelo menos 10% das células neoplásicas
2+ POSITIVO	Coloração fraca, mas bem definida, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em pelo menos 10% das células neoplásicas
3+ POSITIVO	Coloração forte envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em pelo menos 10% das células neoplásicas

QUADRO 5 - Determinação do estado do gene Her2 através do CISH proposto pela Zymed

Sem Amplificação	1 a 5 cópias do gene Her2 presentes em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas
Amplificação Baixa	6 a 10 cópias ou pequenos aglomerados do gene Her2 presentes em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas
Amplificação Alta	Mais de 10 cópias ou aglomerados do gene Her2 presentes em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas

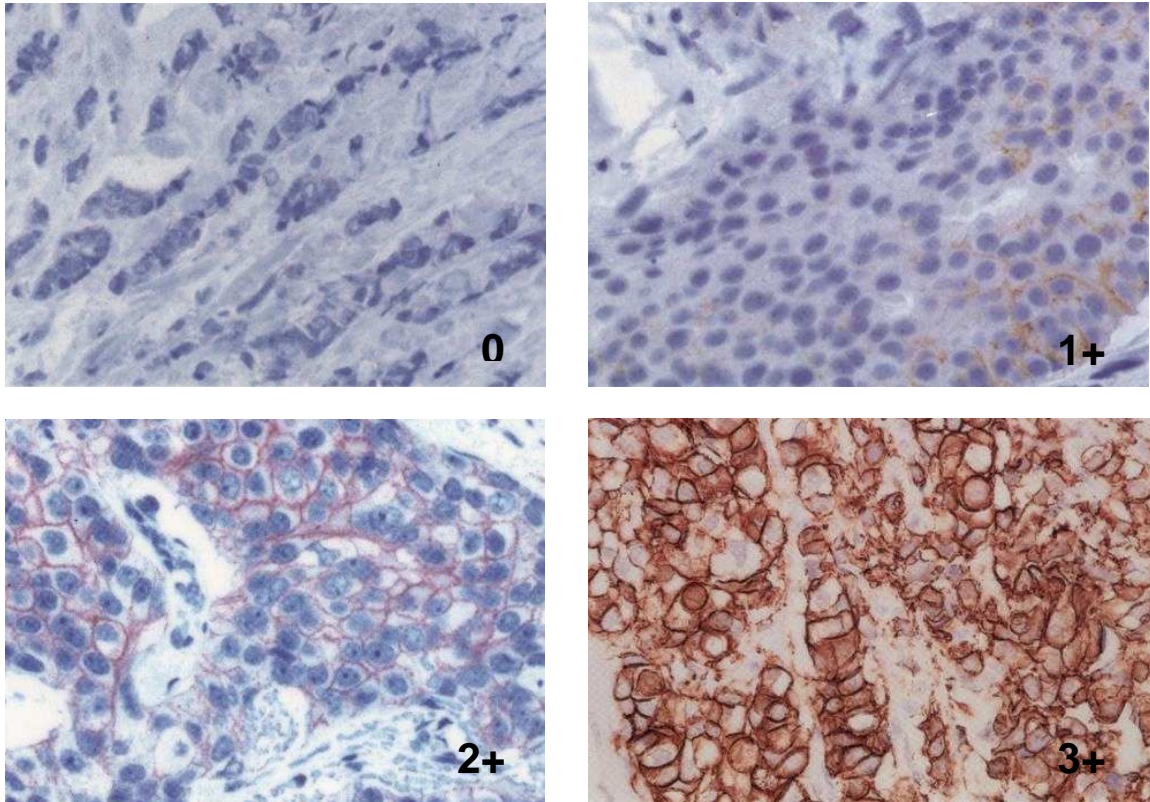


FIGURA 1 – Sistema de escore recomendado no Manual do HercepTest™ (Dako,1999): coloração de membrana

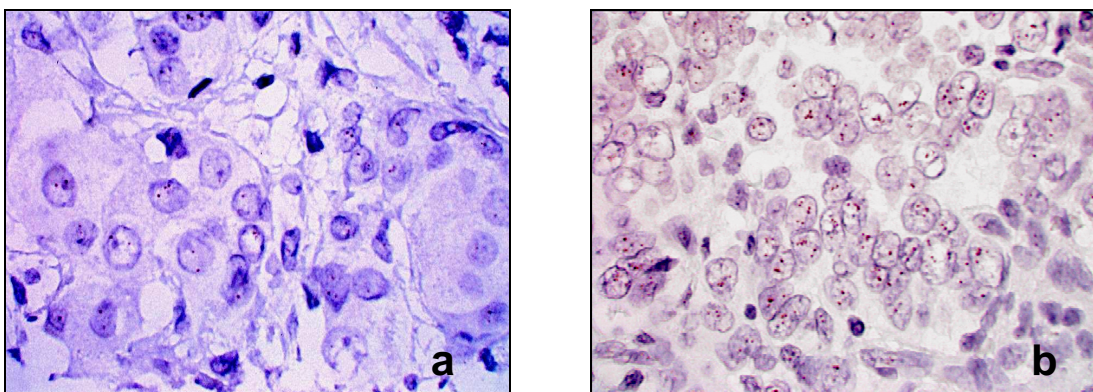


FIGURA 2 – Ilustrações do guia CISH, ZYMED, 2005. (a): CISH não amplificado (1 a 5 pontos nucleares); (b), amplificado (mais de 6 pontos nucleares ou aglomerados)

4 - RESULTADOS

Dos 100 casos estudados, 84 casos foram correlacionados com o CISH com representação de pelo menos um cilindro de cada caso em todos os testes: IIQ e CISH. Os outros 16 casos foram excluídos por perda de discos durante as reações ou por não haver representação tumoral nos discos.

Os resultados e a discussão obtidos a partir do estudo imunoistoquímico comparativo entre o novo anticorpo monoclonal de coelho SP3, anticorpos policlonais e MMabs, sua correlação com hibridação *in situ* cromogênica, e avaliação interobservador usando arrays de tecido, serão apresentados como artigos científicos submetidos a periódicos indexados.

Cada artigo foi estruturado com base nas normas do periódico a que foi submetido.

Após a apresentação dos artigos, seguir-se-ão as conclusões que atendem aos objetivos propostos no início deste trabalho, considerações finais e referências bibliográficas referentes à introdução geral.

4.1 - Artigo I - The novel rabbit monoclonal antibody against Her2: an immunohistochemical and CISH comparative analysis in breast cancer

Submetido para publicação no Histopathology (ISSN: 0309-0167)

The novel rabbit monoclonal antibody against Her2: an immunohistochemical and CISH comparative analysis in breast cancer

Cristiana Buzelin Nunes ¹, Rafael Malagoli Rocha ¹, Jorge Sergio Reis-Filho ², Maryou B Lambros ², Gislene Fátima Silva Rocha ¹, Fernanda Squarcio Fernandes Sanches ¹, Flavio Nepomuceno Oliveira ¹, Helenice Gobbi ¹

Affiliations:

1- Department of Anatomic Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

2- The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, Institute of Cancer Research, London, England.

Corresponding author: Cristiana Buzelin Nunes, MD

Avenida Alfredo Balena 190, sala 5000 Belo Horizonte, MG Brazil

CEP 30130-100

cristianabnunes@gmail.com Tel: (55) (31) 32487118 Fax: (55) (31) 32262591

Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Keywords: Rabbit monoclonal antibody, IHC, CISH, HER2, breast cancer, TMA

Running title: Her2 IHC and CISH comparison

ABSTRACT

Aims: We compared the sensitivity and specificity new rabbit monoclonal antibody SP3 with those of mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies to detect *HER2* amplification as defined by chromogenic *in situ hybridization* (CISH).

Methods and Results: Serial sections from tissue microarrays (TMAs) containing 84 breast carcinomas were submitted to CISH (Zymed *HER2* Spot-Light® kit) and immunohistochemistry, using NeoMarkers SP3 (rabbit monoclonal), DAKO A0485 and DAKO HercepTest (polyclonal), Novocastra CB11, Cell Marque CB11, and Genentech 4D5 (monoclonal). All tests were performed in duplicate and the slides were double-blindly evaluated. 'Sensitivity' and 'specificity' of the antibodies were calculated with CISH as the 'gold standard'. CISH identified *HER2* gene amplification in 54.8% of the tumours. The best concordance was between SP3 and HercepTest ($\kappa=0.74$). SP3, A0485 and HercepTest detected all *HER2* amplified cases. There were 5 non-amplified cases (13%) scored as 3+ using SP3, 2 cases (5.3%) using HercepTest, and 10 cases (26.3%) using A0485. Three amplified cases (6.5%) were negative for CB11 and 1 case (2.2%) was negative for 4D5.

Conclusions: RabMab SP3 is more 'sensitive' than mouse monoclonal antibodies, for Her2 assessment. HercepTest, CB11 and 4D5 show higher 'specificity' than SP3 for the identification of *HER2* gene amplification.

Word-count: 196

INTRODUCTION

None of the recent developments in the understanding of the molecular events underlying breast cancer tumourigenesis has had a greater immediate impact on breast cancer patient management than the identification of the *HER2* oncogene in breast cancer¹⁻⁴. *HER2* gene amplification or protein overexpression is seen in approximately 20 to 30% of invasive breast cancers in humans, most commonly in high grade invasive ductal carcinomas. Her2 overexpression has been reported to be associated with other adverse prognostic factors such as positive lymph nodes, larger tumour size, high histological grade, high proliferation rate, and lack of expression of oestrogen and progesterone receptors⁵⁻⁷.

Recent results from clinical trials have demonstrated that trastuzumab after adjuvant chemotherapy significantly improves disease-free survival among women with Her2-positive breast cancer¹⁻³. These results have led to licensing of trastuzumab for the management of patients with early stage breast cancer patients with Her2 positive tumours. Therefore, accurate, consistent, and reliable methods for evaluation of Her2 have become increasingly important. Different techniques have been used to assess the Her2 status in biopsies and surgical specimens, but currently the most frequently used methods are immunohistochemistry (IHC) to assess Her2 protein overexpression and *in situ* hybridisation to assess *HER2* gene amplification.

IHC is relatively easy to perform, has a short turnaround time and relatively low cost. Immunohistochemical analysis is frequently influenced by technical considerations, such as fixation procedures affecting the quality of antigen epitopes in the formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples and methodological differences (IHC protocols)⁸. Selection of specific antibodies and scoring methods are very important

parameters for the accurate evaluation of protein expression^{9, 10}. Immunohistochemical Her2 scoring is arbitrary depending on the proportion and the intensity of cell membrane staining and has been demonstrated inter and intraobserver variations on determination of Her2 overexpression, especially on intermediate categories¹¹.

The generation of rabbit monoclonal antibodies (RabMabs) represents a novel category of immunoreagents that conjugate the best properties of both mouse monoclonal antibodies (Mabs) and rabbit antisera. When compared with the corresponding Mabs, the RabMabs seem to offer increased sensitivity with no loss of specificity. In routine use they permit higher working dilutions without antigen retrieval leading to significant improvement in laboratory efficiency, contributing to achieve better standardization and acceptable reproducibility¹²⁻¹⁴. Ricardo *et al.*¹⁵ compared SP3 with CB11, having CISH as the gold standard in breast cancer tissue microarrays and showed a high specificity and a moderate sensitivity of SP3.

Overexpression of the Her2 protein generally (around 95%) results from *HER2* gene amplification. Concordance between IHC and *in situ* hybridisation is excellent for cases that are either completely negative or strongly positive by IHC¹⁶. It is now thought that Her2 determination is most efficient using IHC as the method of choice, with *in situ* hybridisation being performed for cancer with indeterminate results (2+ score)^{17, 18}.

Several *in situ* hybridisation techniques are available. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) is thought to be an accurate technique for quantitative evaluation of *HER2* gene status in breast cancer cells. FISH methodology requires a fluorescence microscopy equipped with high quality immersion objectives and fluorescence filters. As the fluorescence signals can fade within several weeks, the

hybridisation results must be recorded with digital cameras. Therefore, analyses and recording of FISH data is expensive and time consuming. Most important, tissue section morphology is not optimal in FISH on FFPE, a particular problem in distinguishing invasive breast cancer and intraductal carcinoma. To overcome these practical limitations, chromogenic *in situ* hybridisation (CISH) has been recently introduced, in which the DNA probe is detected using a simple IHC-like peroxidase reaction. CISH is faster to analyse than FISH, does not require any equipment other than those used in routine histopathology laboratories, and allows for a simultaneous analysis of gene copy number and histological features of the lesions¹⁹⁻²¹. There is a high level of concordance between CISH and FISH²²⁻²⁴. In case of low-level amplification, some authors suggest that CISH chromosome 17 probe should be used, or FISH is recommended for confirmation²⁵⁻²⁷.

Tissue microarrays (TMAs) have been successfully used to study protein expression by immunohistochemistry, with a high concordance rate between standard full and TMA breast cancer sections for Her2^{20, 28-30}.

The aim of this study was to assess on a breast cancer tissue microarray the 'sensitivity' and 'specificity' of the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and five other anti-Her2 antibodies, using *HER2* gene status as defined by CISH as the 'gold standard'.

MATERIALS AND METHODS

Paraffin embedded tissue samples from 84 breast invasive and intraductal carcinomas examined between 1987 and 2005 were selected from the archived files of the Laboratory of Mammary Pathology, School of Medicine, Federal University of

Minas Gerais, Brazil. All cases were previously tested for therapeutic management using the CB11 mouse monoclonal antibody (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK) and blocks were available for TMA construction. We selected 45 cases previously scored as 2+ and 3+, and 39 cases scored as 0 and 1+. Haematoxylin and eosin (H&E) stained slides of the corresponding samples were reviewed and tumours were classified and graded based on College of American of Pathology (1999), Page *et al.* (1998) and Elston & Ellis (1991) criteria³¹⁻³³.

Two representative areas of each tumour were identified and marked on H&E stained slides and the corresponding paraffin embedded tissue blocks were obtained for the construction of the TMA block. Four tissue microarray blocks were constructed by sampling two cores (2.0mm diameter) from each donator block. Sequential 4.0µm thick sections from the TMA blocks were mounted on silane-coated glass slides and dried for 30 minutes at 37°C. The first and the last slide were stained for H&E. The interval slides were subsequently submitted to IHC and CISH.

Immunohistochemistry

IHC staining was performed following a standard protocol. Six different antibodies were tested on two slides from each array: one RabMab (SP3: NeoMarkers), two rabbit polyclonal antibodies (A0485, HercepTest: Dako) and three Mabs (CB11: Novocastra and Cell Marque; 4D5: Genentech). Antibodies, dilutions and antigen retrieval methods are summarized in Table 1. The immunohistochemistry protocol was previously tested and validated in our laboratory¹⁸. The Dako HercepTest™ kit was used according to the manufacturer's instructions. Tissue sections were deparaffinised followed by endogenous peroxidase activity blocking by 20 minute

incubation in 0.3% hydrogen peroxide. Depending on the primary antibody, no pre-treatment, enzyme treatment with trypsin (Sigma, St. Louis, USA), or heat (steamer, 20 minutes at 95°C) induced antigen-retrieval in citrate buffer (10mM, pH 6.0), was used (Table 1). The water bath was employed for HercepTest, following the manufacturer's instructions (Dako). For the NCL-CB11 antibody no pre-treatment was used, given that previous studies of our laboratory showed better performance of this antibody with no antigen retrieval¹⁸. The use of a steamer for heat induced epitope retrieval is reported to have an excellent performance for several antibodies^{18, 34, 35}. Non-specific binding sites were blocked by 10% normal goat serum. Primary antibodies were applied on the sections and incubated for 90 minutes at room temperature. We used a streptavidin-biotin-peroxidase complex technique (SAB- Biogenex®, San Ramon, USA), and visualization with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen solution (liquid DAB, DAKO, Carpinteria, USA). Sections were counterstained with haematoxylin, and cover slipped. All immunostainings were performed manually and run with known positive and negative tumour controls previously tested by FISH. HercepTest™ immunostaining run with the kit control.

The immunostained sections were blindly evaluated without knowledge of the results of CISH analysis, using the HercepTest™ scoring system (0, no staining or membrane staining is observed in less than 10% of tumour cells; 1+, faint/barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the tumour cells, and only part of the membrane is stained; 2+, weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumour cells; 3+, strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumour cells). Cases interpreted as 0 or 1+ were considered negative and those interpreted as 2+ and 3+

were considered weakly and strongly positive, respectively ³⁶. When cytoplasmic immunostaining was detected, it was considered not to be specific and, therefore, not incorporated into the final scoring.

Table 1 - Antibodies clones, types, sources, dilutions and antigen retrieval methods used

Clone	Type of antibody	Source	Dilution	Antigen retrieval/time
SP3	Rabbit Monoclonal	NeoMarkers, Fremont, USA	1:300	Steamer/25 min
HercepTest	Rabbit Polyclonal	Dako, Carpinteria, USA	Prediluted	Water bath/40min
A0485	Rabbit Polyclonal	Dako, Carpinteria, USA	1:750	Steamer/25 min
NCL-CB11	Mouse Monoclonal	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK	1:80	No pre-treatment
CM-CB11	Mouse Monoclonal	Cell Marque, Santa Barbara, USA	Prediluted	Steamer/25 min
4D5	Mouse Monoclonal	Genentech, South San Francisco, USA	1:250	Trypsin/5min

CISH

CISH was performed at The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, Institute of Breast Cancer Research, London; England (J.S.R-F., M.B.L.). The Zymed *HER2* Spot-Light® kit (Zymed, South San Francisco, USA) was used according to the manufacturer's instructions. CISH was evaluated using the Zymed *HER2* CISH interpretation guidelines. At least 30, non-equivocal and non-overlapping neoplastic cells were counted per case. Non-amplified cases were defined as those with one to five signals per nucleus in >50% of tumour cells; amplification was defined as i) more

than 5 gene copies per nucleus in >50% of tumour cells, ii) when a small or large gene copy clusters were found in >50% of tumour cells³⁷.

Statistics

Statistical analysis was performed and confidence intervals (CI) were calculated using EpiÍnfo version 6.04. The Kappa test was applied to compare the RabMab SP3 Her2 overexpression with the other antibodies. CISH test was used as the 'gold standard', and overall 'sensitivity' and 'specificity' were calculated for each antibody staining, considering 3+ cases as positive, 2+ cases as borderline (indeterminate or equivocal), and 0 and 1+ as negative.

RESULTS

IHC

Her2 protein high overexpression (3+) was clearly seen using 10X or 20X objectives in tissue sections that were counterstained with haematoxylin. Her2 protein weak overexpression (2+) was distinguishable using 40X objective. Lack of Her2 protein overexpression was distinguished using 20X and 40X objectives.

In a series of 84 breast cancers, the detection of Her2 protein overexpression was more prevalent with the polyclonal antibodies A0485 (66 cases, 78.6%), HercepTest (51 cases, 60.8%) and the RabMab SP3 (61 cases, 72.6%) than with the monoclonal antibodies CB11 (45 cases, 53.5%) and 4D5 (47 cases, 55.9%). There was a 96.7% concordance between 2+ and 3+ results obtained with SP3 and A0485 antibodies. The concordance between 2+ and 3+ results obtained with SP3 and HercepTest,

SP3 and 4D5, and SP3 and CB11 antibodies were 83.6%, 77% and 73.8% respectively (Table 2). The concordance (unweighted Kappa scores) between SP3 and HercepTest, A0485, 4D5 and both CB11 was 0.74, 0.71, 0.65 and 0.61, respectively.

Table 2 - Comparison between the Her2 overexpression using six different antibodies in 84 breast cancers

IHC score	Her2 antibodies					
	SP3	A0485	HercepTest	NCL-CB11	CM-CB11	4D5
0	14 (16.7%)	10 (11.9%)	27 (32.1%)	37 (44.0%)	32 (38.1%)	33 (39.3%)
1+	9 (10.7%)	8 (9.5%)	6 (7.1%)	2 (2.4%)	7 (8.3%)	4 (4.8%)
2+	13 (15.5%)	10 (11.9%)	5 (6.0%)	6 (7.1%)	7 (8.3%)	7 (8.3%)
3+	48 (57.1%)	56 (66.7%)	46 (54.8%)	39 (45.2%)	38 (45.2%)	40 (47.6%)

NCL, Novocastra; CM, Cell Marque

IHC and CISH

CISH staining results were analysed using a 40X objective in tissue sections counterstained with light haematoxylin. CISH identified *HER2* gene amplification in 46 tumours (54.8%).

The correlations between *HER2* gene amplification and protein overexpression are summarized in Table 3.

'Sensitivity' and 'specificity' of the antibodies are summarized in table 4 and were calculated considering 3+ cases as positive, 2+ cases as borderline (indeterminate or equivocal), and 0 and 1+ cases were considered negative. SP3 and A0485 were more 'sensitive' and 4D5 and CB11 were more 'specific', and HercepTest was 100% 'sensitive' and 94.1% 'specific'.

We have defined 'sensitivity' and 'specificity' according to the decision trees proposed by HER2 assessment. In other words, the most 'sensitive' antibody would be the one that identifies all patients that would be eligible to trastuzumab therapy and the most 'specific', the antibody that identifies as negative (0/1+) cases that are not amplified (would receive no therapy)

Table 3 - Semiquantitative IHC scores against amplification of *HER2* gene by CISH

CISH	IHC																		Total
	SP3			A0485			HercepTest			NCL-CB11			CM-CB11			4D5			
	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	0/1+	2+	3+	
NA	23	10	5	18	10	10	32	4	2	36	1	1	36	1	1	36	0	2	38
A	0	3	43	0	0	46	0	2	44	3	5	38	3	6	37	1	7	38	46
Total	23	13	48	18	10	56	32	6	46	39	6	39	39	7	38	37	7	40	84

IHC, immunohistochemistry; CISH, chromogenic *in situ* hybridisation; NCL, Novocastra; CM, Cell Marque; NA, no amplification (1-5 signals per nucleus); A, amplification (>5 signals per nucleus), discordant cases are highlighted

Table 4 – 'Sensitivity' and 'specificity' of antibodies compared to CISH

Antibodies	'Sensitivity'	95% CI	'Specificity'	95% CI
SP3	100.0	89.8-100.0	82.1	62.4-93.2
A0485	100.0	90.4-100.0	64.3	44.1-80.7
HercepTest	100.0	90.4-100.0	94.1	78.9-99.0
NCL-CB11	92.7	79.0-98.1	97.3	84.2-99.9
CM-CB11	92.5	78.5-98.0	97.3	84.2-99.9
4D5	97.4	84.9-99.9	94.7	80.9-99.1

CISH, chromogenic *in situ* hybridisation; NCL, Novocastra; CM, Cell Marque

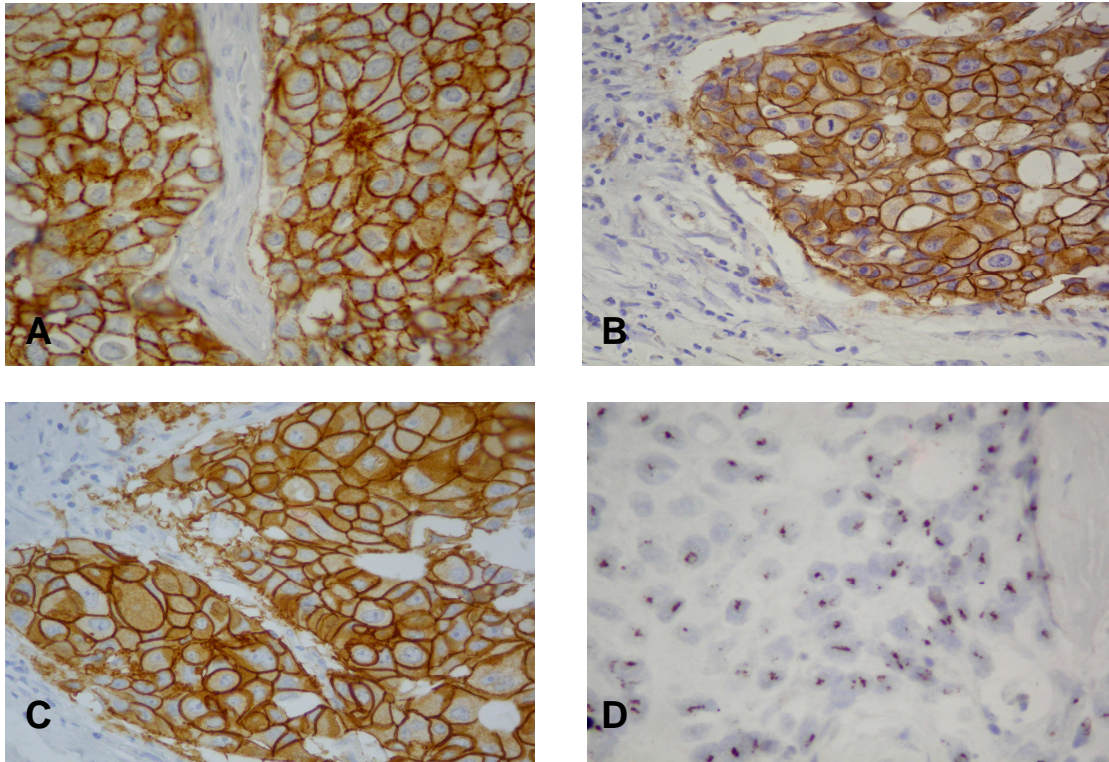


Figure 1. Her2 overexpression and gene amplification in the same case of invasive breast cancer (X400). A, HercepTest; B, CB11; C, SP3; D, CISH.

DISCUSSION

Accurate testing for Her2 aims to ensure that every patient who might benefit from trastuzumab receives appropriate treatment and that costly and potentially cardiotoxic trastuzumab treatment³⁸ is not given to patients with non-overexpressing tumours. Inconsistencies in the sensitivity of IHC Her2 testing have been attributed to the use of different antibodies, differences in tissue fixation and IHC reagents, antigen retrieval methods, and interobserver variability³⁹. The HercepTest kit has overcome some of these problems by using standardized methodology and reagents and by the inclusion of cell line controls. Nonetheless, the reported sensitivity varies between different centres and HercepTest kit is significantly more expensive than other commercially available antibodies. Despite the commercially variety of IHC

antibodies available, there is no consensus about the best antibody for Her2 testing⁴⁰.

In this study we tested the novel RabMab antibody SP3 and monoclonal and polyclonal antibodies against Her2 and correlated the results with those of *HER2* gene status assessment by CISH using a breast cancer TMA. We also included the 4D5 antibody, which is a component of trastuzumab and not commercially available. TMA has the advantage to process all tissue samples at the same time and conditions such as room temperature and humidity and also reduces costs and time. All tumours included should have the same pre-analytical and analytical treatment to have an optimal study. In our study we used tumours with different time of fixation to build our TMAs, which should bring difficulties on the adjustment of digestion time on each sample and on immunohistochemical tests.

CISH has been validated in many reports compared to FISH, with a high concordance rate. CISH is reported to have the same accuracy of FISH when a high level amplification is detected, and 93-99% of agreement when low level amplification is detected²⁴. CISH is also accepted for *HER2* gene amplification by the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists Guidelines, based on European, Canadian and Australian studies⁴¹. CISH permits simultaneous evaluation of gene copies, tumour cell and tissue morphology on the same slide^{9, 21-23}. The current *HER2* CISH is based on single-colour detection, without centromere 17 correction. Despite the fact that some authors consider the chromosome 17 copy correction to be essential⁴²⁻⁴⁴, there is no international consensus as to which system should be used. Wang *et al.* observed the highest correlation with Her2 protein overexpression and *HER2* gene dosage and the lowest correlation with aneusomy 17. For clinical assessment of *HER2* status, aneusomy 17 was not a

significant factor for IHC-FISH discordance in most cases ⁴⁵. Polysomy 17 might be involved with the prediction of response to trastuzumab, but it should not play a major role. Most importantly, in a recent trial for docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab, single probe CISH was successfully used as part of the entry criteria ¹.

The incidence of Her2 overexpression in invasive breast cancer is reported to range from 20% to 30% ^{4, 16, 46}. Our series included Her2 previously tested tumours, most of them diagnosed as ductal high grade invasive carcinoma. The Her2 overexpression in the present study ranged from 45.2% (CB11) to 66.7% (A0485). *HER2* gene amplification was observed in 54.8% of cases. When compared with other antibodies, the highest concordance rate was with HercepTest followed by A0485, both polyclonal antibodies. The better performance of Dako HercepTest versus A0485 (same antibody clone) may be related to the different detection systems and other reagents provided within the HercepTest™ kit. Ricardo et al. showed a high level of agreement between SP3, CB11 and CISH, with 99.1% of specificity and 52.3% of sensitivity, and they had 31.1% of amplified cases ¹⁵.

When we compared IHC with CISH results, SP3 displayed an optimal 'sensitivity', similar to that obtained with anti-Her2 polyclonal antibodies (i.e. HercepTest and A0485). They identified all cases with *HER2* amplification using the current guidelines for Her2 assessment. However, 2 (5.2%) HercepTest, 5 (13.1%) SP3 and 10 (26.3%) A0485 non-amplified cases were scored as 3+. Based on the concept of oncogene addiction and the requirement of genomic changes, there is a growing belief that only *HER2* amplified cases respond to trastuzumab; hence it is yet to be determined if these patients would actually benefit from trastuzumab or Her2 small molecule tyrosine kinase inhibitors.

Although less 'sensitive', both MMab (CB11 and 4D5) showed more 'specificity' than RabMab SP3. Polyclonal antibodies are known to be more sensitive and monoclonal antibodies, more specific. MMab membrane staining favours the presence of gene amplification^{40, 46}; however, we observed 3/46 (6.5%) of *HER2* CISH amplified cases with no CB11 immunoreactivity. The upper limit of 5% false-negative should be considered high in view of the curative potential of trastuzumab treatment in the adjuvant setting⁴¹. Therefore, these antibodies should be used with caution.

Sapino et al. suggests a double IHC staining for MMab, and a double scoring system for Her2 overexpression with six score values (0/1+ and 2+ negative; 3+, 4+, 5+ and 6+ positive) obtained by summing the individual scoring values from each MMab. In their study they observed all double scoring negative cases were non-amplified and all cases scored 6+ were amplified by CISH, using MMabs directed against different Her2 domains: CB11 and TAB250⁴⁷. SP3 is directed against the extracellular domain of Her2 and CB11 is directed against the intracytoplasmic domain of the protein, and SP3 showed a high 'sensitivity' and CB11, a high 'specificity'.

What would be the ideal antibody for Her2 testing? The most 'sensitive' antibodies (i.e. Herceptest, SP3, A0485) detect all *HER2* CISH amplified cases and ensure that patients with amplified tumours receive the most appropriate treatment. However these antibodies also have a downside, given that up to 26.3% of patients with non-amplified tumours show Her2 3+ positivity and would receive a rather expensive and cardiotoxic treatment. On the other hand, the most 'specific' antibodies (i.e. CB11 and 4D5) have a remarkably low prevalence of false positives, however owing to their suboptimal 'sensitivity', up to 10% of the patients with amplified tumours would be denied anti-Her2 therapy. Based on these findings, we suggest that HercepTest (100% 'sensitivity' and 94.1% 'specificity') and SP3 (as a second option with 100%

'sensitivity' and 82.1% of 'specificity') should be used for first trial of Her2 overexpression and that all 2+ cases should be FISH or CISH tested, according with the UK guidelines and the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists recommendations for Her2 Testing in breast cancer^{41, 48}.

In conclusion, RabMab SP3 is more 'sensitive' than mouse monoclonal antibodies, for Her2 assessment. HercepTest, CB11 and 4D5 show higher 'specificity' than SP3 for the identification of *HER2* gene amplification.

ACKNOWLEDGMENT: *The authors thank David L. Page, MD (Department of Pathology, Vanderbilt University, Nashville, TN) for providing the antibody 4D5.*

REFERENCES

1. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P *et al.* Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006;**354**;809-820.
2. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B *et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;**353**;1659-1672.
3. Romond EH, Perez EA, Bryant J *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;**353**;1673-1684.
4. Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: new opportunities and new challenges. *Mod. Pathol.* 2001;**14**;213-218.
5. Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab. Invest.* 2002;**82**;1007-1014.
6. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1999;**112**;S53-67.
7. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;**235**;177-182.

8. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J. Clin. Pathol.* 2000;**53**;374-381.
9. Hanna W, Kahn HJ, Trudeau M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod. Pathol.* 1999;**12**;827-834.
10. Mitchell MS, Press MF. The role of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization for HER2/neu in assessing the prognosis of breast cancer. *Semin. Oncol.* 1999;**26**;108-116.
11. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E *et al.* Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002;**94**;852-854.
12. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Chan JK. Consistent immunostaining for cyclin D1 can be achieved on a routine basis using a newly available rabbit monoclonal antibody. *Am. J. Surg. Pathol.* 2004;**28**;801-807.
13. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB *et al.* Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. *Mod. Pathol.* 2006;**19**;999-1009.
14. Rossi S, Laurino L, Furlanetto A *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005;**124**;295-302.
15. Ricardo S, Milanezi F, Carvalho S, Leitao D, Schmitt F. HER2 Evaluation through the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2006.
16. Bankfalvi A, Simon R, Brandt B *et al.* Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology.* 2000;**37**;411-419.
17. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME *et al.* HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw.* 2006;4 Suppl 3:S1-22; quiz S23-4.
18. Gouvea AP, Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2006;**14**;103-108.
19. Lambros MB, Simpson PT, Jones C *et al.* Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescent in situ hybridization. *Lab. Invest.* 2006;**86**;398-408.
20. Loring P, Cummins R, O'Grady A, Kay EW. HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005;**13**;194-200.
21. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod. Pathol.* 2002;**15**;657-665.

22. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am. J. Clin. Pathol.* 2005;**123**;237-243.
23. Bilous M, Morey A, Armes J, Cummings M, Francis G. Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology.* 2006;**38**;120-124.
24. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod. Pathol.* 2006;**19**;481-487.
25. Gong Y, Gilcrease M, Sneige N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod. Pathol.* 2005;**18**;1015-1021.
26. Kounelis S, Kapranos N, Malamos N, Kouri-Bairaktari E. Evaluation of HER2 gene status in breast cancer by chromogenic in situ hybridization: comparison with immunohistochemistry. *Anticancer Res.* 2005;**25**;939-46.
27. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A *et al.* Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am. J. Pathol.* 2000;**157**;1467-1472.
28. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab. Invest.* 2000;**80**;1943-1949.
29. Saez A, Andreu FJ, Segui MA *et al.* HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast.* 2006;**15**;519-527.
30. Selvarajan S, Tan SY, Sii LH, Tan PH. c-erbB-2 (HER-2/neu) immunohistochemistry in invasive breast cancer: is there concordance between standard sections and tissue microarrays? *Pathology.* 2006;**38**;316-320.
31. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab. Med.* 2000;**124**;966-978.
32. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998;**51**;195-208.
33. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;**19**;403-410.
34. Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology.* 2000;**36**;168-177.
35. Gobbi H, Dupont WD, Simpson JF *et al.* Transforming growth factor-beta and breast cancer risk in women with mammary epithelial hyperplasia. *J Natl. Cancer Inst.* 1999;**91**;2096-2101.
36. DAKO. DAKO HercepTest A manual for interpretation. Carpinteria: DAKO; 1999:manual guideline.

37. Zymed®. Spot-Light® CISH™ Probes and CISH™ Detection. South San Francisco; 2005.
38. Hayes DF, Picard MH. Heart of darkness: The downside of trastuzumab. *J. Clin. Oncol.* 2006;**24**;4056-4058.
39. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J. Clin. Oncol.* 2002;**20**;3095-3105.
40. Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ *et al.* HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod. Pathol.* 2001;**14**;1079-1086.
41. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz J.N *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006.
42. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA *et al.* Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer. *J. Pathol.* 2001;**195**;422-428.
43. Farabegoli F, Ceccarelli C, Santini D *et al.* c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int. J. Cancer.* 1999;**84**;273-277.
44. McCormick SR, Lillemoe TJ, Beneke J, Schrauth J, Reinartz J. HER2 assessment by immunohistochemical analysis and fluorescence in situ hybridization: comparison of HercepTest and PathVysion commercial assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002;**117**;935-943.
45. Wang S, Hossein Saboorian M, Frenkel EP *et al.* Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER-2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER-2/neu status. *Mod. Pathol.* 2002;**15**;137-45.
46. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod. Pathol.* 2000;**13**;37-45.
47. Sapino A, Marchio C, Senetta R *et al.* Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch.* 2006;**449**;288-296.
48. Ellis IO, Bartlett J, Dowsett M *et al.* Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J. Clin. Pathol.* 2004;**57**;233-237.

4.2 - Artigo 2 - Concordância interobservador na interpretação imunoistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em *arrays* de carcinomas mamários

Submetido para publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial
(ISSN 1676-2444)

Concordância interobservador na interpretação imunoistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em *arrays* de carcinomas mamários

Interobserver agreement in scoring immunohistochemical overexpression of Her2 detected by five different antibodies on tissue microarrays of breast carcinomas

Cristiana Buzelin Nunes 1; Rafael Malagoli Rocha 2; Agostinho Pinto Gouvêa 3; Luciene Simões de Assis Tafuri 4; Vanessa Fortes Zschaber Marinho 5; Marina Alvarenga Rezende 6; Helenice Gobbi 7.

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina
2. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Patologia na UFMG
3. Doutor em Patologia pela UFMG, Médico-Patologista do Hospital das Clínicas da UFMG
4. Doutora em Patologia pela UFMG, Professora de Patologia Geral da Fundação Mineira de Educação e Cultura
5. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia na UFMG
6. Estudante de Graduação em Medicina, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais
7. Professora Associada, Doutora em Patologia do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG

Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM/UFMG),

Autora para correspondência:

Cristiana Buzelin Nunes

Departamento de Anatomia Patológica

Faculdade de Medicina da UFMG Avenida Alfredo Balena, 190, sala 5000

30130100 Belo Horizonte, MG

Email: cristianabnunes@gmail.com

Apoio financeiro: CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

Objetivo: Estudar a concordância interobservador na interpretação da superexpressão imunoistoquímica para a proteína Her2 empregando diferentes anticorpos em *arrays* de carcinomas mamários.

Material e método: Foi construído um *array* contendo dois cilindros (2,0mm de diâmetro cada) de 25 carcinomas mamários. Cortes histológicos seriados do *array* foram submetidos à imunoistoquímica utilizando-se cinco anticorpos anti-Her2: SP3 (NeoMarkers), HercepTest e A0485 (Dako), CB11 (Novocastra) e 4D5 (Genentech). Uma lâmina corada por cada anticorpo (total=5 lâminas) foi submetida à avaliação individual por cinco observadores seguindo o sistema de escore proposto no HercepTest™. Para a avaliação interobservador os resultados foram interpretados em três diferentes análises: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 e 1+; 2+ e 3+) e III (0 e 1+; 2+; 3+) e aplicado o teste estatístico de Kappa.

Resultados: A concordância interobservador foi boa quando os casos foram avaliados em quatro categorias (0; 1+; 2+; 3+). Quando foram avaliados em duas categorias (0 e 1+; 2+ e 3+), a concordância interobservador foi boa para os casos corados por SP3 e CB11, e muito boa para os casos corados por A0485, HercepTest e 4D5. Na análise III (0 e 1+; 2+; 3+), a concordância interobservador foi considerada moderada para os casos corados por CB11, e boa para os casos corados pelos outros anticorpos.

Conclusão: A concordância interobservador foi considerada entre moderada e muito boa na avaliação dos cinco anticorpos. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos com marcação fraca (1+) e moderada (2+). A experiência dos observadores influenciou nas taxas de concordância.

Palavras-chave: concordância interobservador, imunoistoquímica, Her2, c-erbB-2, carcinomas mamários.

Total: 249 palavras

ABSTRACT

Aim: To examine interobserver agreement in immunohistochemical evaluation of Her2 overexpression using five different antibodies on breast cancer arrays.

Material and method: One array was built with 2 cores (2.0mm diameter each) from 25 breast carcinomas. Serial sections from the array were submitted to immunohistochemistry using five anti-Her2 antibodies: SP3 (NeoMarkers), HercepTest and A0485 (Dako), CB11 (Novocastra), and 4D5 (Genentech). One slide immunostained for each antibody (total=5 slides) were independently scored by five observers following HercepTest™ scoring system. Interobserver agreement was evaluated in three different analysis: I (0; 1+; 2+; 3+); II (0 and 1+; 2+ and 3+) and III (0 and 1+; 2+; 3+), and the Kappa statistics was applied.

Results: There was a good rate of interobserver agreement when the four scores where considered (0; 1+; 2+; 3+). When the scores where considered in two categories (0 and 1+; 2+ and 3+) the interobserver agreement rate was considered substantial for cases stained for SP3 and CB11, and almost perfect for cases stained for A0485, HercepTest and 4D5. For group III evaluation (0 and 1+; 2+; 3+), a moderate rate of interobserver agreement was considered for cases stained for CB11, and a substantial rate for other antibodies.

Conclusion: The overall interobserver agreement was considered moderate to substantia in the evaluation of cases stained for the five antibodies. The lowest rate of agreement was obtained in the evaluation of the cases scored as weak (1+) and moderate (2+). The observers experience altered the concordance rates.

Keywords: interobserver agreement, immunohistochemical, Her2, c-erbB-2, breast cancer.

Word count: 245 words

INTRODUÇÃO

A proteína Her2, um receptor de atividade tirosina-quinase, encontra-se superexpressa em cerca de 30% dos carcinomas ductais invasores, e a superexpressão protéica está geralmente associada à amplificação gênica (1). A amplificação/superexpressão de Her2 está associada a tumores mamários de comportamento biológico agressivo, principalmente em pacientes com linfonodo-positivo (23). No entanto, em pacientes linfonodo-negativos esta associação ainda é pouco definida (8). Os trabalhos pioneiros de Slamon *et al.* (1987) apontaram o Her2 como fator prognóstico independente no câncer de mama (24). Estudos posteriores mostraram a sua associação com outros fatores prognósticos, entre eles comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, alto grau histológico, elevado índice proliferativo e ausência de expressão de receptores hormonais (4, 19).

Tumores que superexpressam Her2 são menos responsivos a ciclofosfamida, metotrexate, 5-fluorouracil (CMF) e ao tamoxifeno, e mais responsivos às antraciclinas do que tumores sem superexpressão de Her2 (13, 16). A detecção do Her2 se tornou mais importante após a aprovação do trastuzumab, que associado à quimioterapia, pode diminuir a progressão tumoral do carcinoma mamário invasor (13). Existe, então, uma grande demanda clínica para detecção precisa do status do Her2 em carcinomas mamários invasores. Apesar de existir uma variedade de métodos diferentes para detectar o status do Her2, os dois testes recomendados na prática clínica são a imunohistoquímica (IIQ) para detecção de superexpressão protéica e a hibridação *in situ* para detecção de amplificação gênica (29). A reação imunohistoquímica é o teste de rotina mais atrativo para a avaliação do Her2 em carcinomas mamários devido ao menor custo, facilidade técnica e relevância biológica. A IIQ detecta a superexpressão protéica do Her2 localizada na membrana

citoplasmática da célula tumoral. Há vários anticorpos mono e policlonais disponíveis comercialmente para o uso em IIQ com diferenças na sensibilidade e especificidade podendo resultar em variação na qualidade final das reações (8, 9).

Assim, a escolha do anticorpo primário tem importância fundamental no resultado final do teste imunoistoquímico que poderá influenciar decisões terapêuticas no tratamento de cada paciente individualmente. Não há na literatura definição sobre quais anticorpos seriam mais específicos e sensíveis para a avaliação do Her2 através de IIQ (2, 8).

A forma mais utilizada para avaliar a superexpressão da proteína Her2 na membrana detectada por IIQ é semiquantitativa e não automatizada, empregando um sistema de escore proposto no HercepTest™ (3). Este sistema avalia a proporção de células com membrana corada e a intensidade da reação gerando uma escala de quatro pontos que varia de zero ("0") a três ("3"). O emprego desta escala tem variações de interpretação que dependem da qualidade técnica da reação, do tipo de anticorpo empregado e da experiência do examinador. Mesmo para um patologista treinado, a distinção nítida entre categorias nominais é difícil e geralmente arbitrária, e tem sido demonstrada falta de reprodutibilidade na determinação da superexpressão do Her2, principalmente das categorias intermediárias (1+ e 2+) (14).

Estudos de comparação do teste imunoistoquímico para detecção de superexpressão do Her2 entre laboratórios mostram maior índice de concordância entre laboratórios de referência, destacando a importância do treinamento com maior volume de casos analisados e experiência do patologista (6, 15).

Há estudos que abordaram variações na técnica imunoistoquímica para determinação do Her2, principalmente comparando diferentes anticorpos mono e policlonais (20, 22, 28), incluindo trabalhos de nosso grupo (8, 9). No entanto há

poucos estudos sobre a variação interobservador na análise da reação IIQ para Her2 (10, 11, 24, 26, 27).

No presente trabalho, decidimos estudar a variação na interpretação da reação imunohistoquímica para Her2 empregando diferentes anticorpos em *array* de carcinomas mamários.

MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionados 25 carcinomas mamários diagnosticados no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG. A partir da revisão das lâminas originais foram selecionados os blocos de parafina contendo amostras representativas dos tumores. Dois cilindros de 2,0mm de diâmetro foram obtidos de cada bloco doador construindo-se um *array* com 50 amostras de carcinomas. Foram incluídos ainda três cilindros de fígado (cilindros iniciadores de leitura) e dois cilindros de tumores previamente testados utilizados como controles negativo e positivo, totalizando 55 cilindros. O *array* foi construído utilizando um equipamento alternativo não comercial desenvolvido e validado no próprio laboratório (18). O bloco do *array* foi submetido a cortes histológicos seriados de 4µm, colhendo-se as secções em lâminas silanizadas, que foram numeradas seqüencialmente. A primeira e a última lâmina foram coradas pela hematoxilina e eosina. As lâminas dos intervalos foram coradas pela IIQ utilizando cinco diferentes anticorpos. Os anticorpos utilizados, suas diluições e métodos de reativação antigênica estão listados na Tabela 1. Para o HercepTest foi empregado o respectivo kit seguindo-se as instruções do fabricante. Para os demais anticorpos o método empregado foi o da estreptavidina-biotina peroxidase (Biogenex®, San Ramon, EUA). Dependendo do anticorpo primário, nenhum pré-tratamento, tratamento com tripsina (Sygma, St.

Louis, EUA), ou com solução de citrato em calor úmido (10mM, pH 6,0), foram utilizados para reativação antigênica (Tabela 1). A revelação foi feita com diaminobenzidina (Liquid DAB, Dako, Carpinteria, EUA) e a contra-coloração, com hematoxilina de Harris. Os protocolos de reação foram previamente padronizados e validados no laboratório para uso em pesquisa (7, 8) e rotina clínica.

Cinco lâminas do *array* de câncer de mama coradas pelos SP3, HercepTest, A0485, CB11 e 4D5 foram distribuídas a cinco observadores (C.B.N., A.P.G., V.F.Z.M., L.S.A.T. e H.G.). Todos os observadores tinham experiência prévia na avaliação do Her2 por imunistoquímica variando de 4 a 10 anos. As lâminas foram codificadas por um dos pesquisadores (M.A.R.) e analisadas individualmente e em separado pelos observadores, sem o conhecimento do tipo de anticorpo e do resultado da leitura das reações feitas pelos demais colegas. Todos os observadores receberam uma planilha contendo campos correspondentes à disposição dos discos de tumores no *array*, para cada uma das cinco lâminas. Eles preencheram as planilhas de acordo com sua interpretação do estudo imunistoquímico de cada um dos cinco anticorpos, empregando o sistema de escore do HercepTest™ (3).

Para a avaliação da concordância interobservador, os resultados foram interpretados em três diferentes análises. Na análise I, os resultados foram considerados separadamente em quatro categorias (0; 1+; 2+ e 3+). Na análise II, os casos foram analisados em duas categorias agrupando-se os casos classificados como 0 e 1+ em conjunto (casos negativos), e os casos 2+ e 3+ em conjunto (casos positivos), como se faz na interpretação do HercepTest. Na análise III, os casos foram considerados em três categorias sendo os casos 0 e 1+ considerados negativos, os casos 2+ indeterminados, e os casos 3+ considerados positivos.

Tabela 1 – Anticorpos, fabricantes, diluições e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imunoistoquímicas

Anticorpo	Tipo de Anticorpo	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica
SP3	Monoclonal, coelho	NeoMarkers, EUA	1:300	Citrato pH 6,0 por 25' em panela a vapor a 98°C
HercepTest	Policlonal, coelho	Dako, EUA	Pronto para uso	Citrato por 40' em banho-maria a 98°C
A0485	Policlonal, coelho	Dako, EUA	1:750	Citrato pH 6,0 por 25' em panela a vapor a 98°C
CB11	Monoclonal, camundongo	Novocastra, RU	1:80	Não realizada
4D5	Monoclonal, camundongo	Genentech, EUA	1:250	Tripsina por 5'

EUA=Estados Unidos da América; RU=Reino Unido

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da concordância interobservador na leitura das reações foi realizada utilizando-se o teste estatístico de kappa (κ). Os valores de κ foram divididos em intervalos para avaliar o grau de concordância segundo os critérios de Landis e Koch (12). O grau de concordância foi considerado baixo quando o valor do kappa foi entre 0,00 e 0,20; razoável, entre 0,21 e 0,40; moderado, entre 0,41 e 0,60; bom, entre 0,61 e 0,80 e muito bom, entre 0,80 e 1,00.

RESULTADOS

Os resultados da concordância entre os cinco observadores para cada anticorpo em cada um dos três grupos analisados estão sumarizados na Tabela 2 e ilustrados nas Figuras 1 e 2.

A concordância geral entre os cinco observadores para avaliação de cada anticorpo nas três diferentes análises foi considerada de moderada a muito boa ($\kappa=0,596$ a $0,872$). A melhor concordância foi observada quando os resultados foram agrupados em 0 e 1+; 2+ e 3+ (análise II) para as lâminas coradas pelos cinco anticorpos. A concordância interobservador foi muito boa nesta análise, para as lâminas coradas pelos anticorpos A0485, Herceptest e 4D5 ($\kappa=0,872$; $0,858$ e $0,855$, respectivamente). A menor concordância entre os observadores foi obtida quando as reações foram analisadas em quatro categorias 0; 1+; 2+; 3+ (análise I) nas lâminas coradas pelo SP3, A0485 e HercepTest ($\kappa=0,641$; $0,609$ e $0,658$, respectivamente). A menor concordância interobservador foi obtida quando os casos 2+ foram analisados separadamente (análise III) nas lâminas coradas pelo 4D5 ($\kappa=0,621$) e CB11 ($\kappa=0,596$), e foi interpretada como moderada nas lâminas coradas pelo CB11. Os casos corados pelos anticorpos policlonais (HercepTest e A0485) e pelo RabMab SP3 mostraram marcação das reações mais forte; porém o A0485 mostrou maior coloração citoplasmática inespecífica,. Os casos corados pelos anticorpos monoclonais de camundongo, mostraram marcação mais fraca do que o RabMab SP3.

Quando avaliada a concordância interobservador entre os três observadores (C.B.N., A.P.G., H.G.) com maior experiência na avaliação imunoistoquímica do Her2 (maior que quatro anos), o valor de κ variou de $0,765$ a $0,972$ nos três diferentes análises.

Tabela 2 - Valores de Kappa da avaliação da concordância interobservador na interpretação da reação imunoistoquímica do Her2 usando cinco diferentes anticorpos analisando os resultados em três grupos

Anticorpo	Valor de Kappa (Intervalo de confiança)		
	Grupo I (0; 1+; 2+; 3+)	Grupo II (0 e 1+; 2+ e 3+)	Grupo III (0 e 1+; 2+; 3+)
SP3	0,641 (0,567-0,716)	0,771 (0,653-0,888)	0,701 (0,609-0,793)
A0485	0,609 (0,540-0,679)	0,872 (0,764-0,980)	0,708 (0,791-0,625)
HercepTest	0,658 (0,585-0,731)	0,858 (0,751-0,964)	0,706 (0,620-0,677)
CB11	0,611 (0,541-0,680)	0,747 (0,641-0,853)	0,596 (0,516-0,677)
4D5	0,636 (0,575-0,696)	0,855 (0,764-0,945)	0,621 (0,621-0,765)

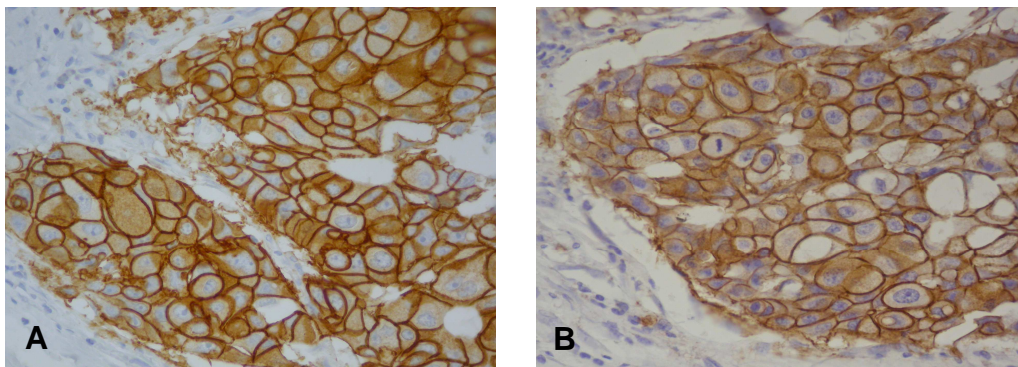


Figura 1 - Caso 23 corado pelos anticorpos SP3 (A) e CB11 (B), avaliado com escore 3+ por todos os observadores (400X)

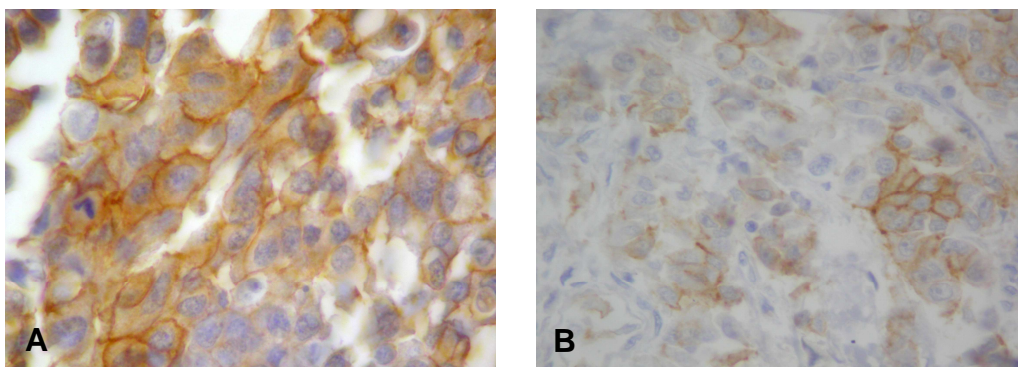


Figura 2 - Caso 22 corado pelo anticorpo CB11 (A) e caso 4 corado pelo HercepTest (B), ambos analisados com escores variáveis (1+, 2+ ou 3+) pelos observadores (400X)

DISCUSSÃO

A detecção correta do Her2 assegura que pacientes com tumores que superexpressam Her2 recebam tratamento adequado, e que um tratamento com trastuzumab, de custo elevado e potencialmente tóxico, não seja indicado a pacientes com tumores sem superexpressão da proteína Her2. Dificuldades na consistência da avaliação IIQ do Her2 têm sido atribuídas ao uso de anticorpos diferentes, e às diferenças nas fases pré-analítica e analítica da reação (17, 28).

Recentemente surgiu uma nova geração de anticorpos monoclonais de coelhos (RabMabs), cujos fabricantes relatam ter alta afinidade, sensibilidade e especificidade, com marcação bem definida na imunistoquímica (21). Em nosso trabalho, estudamos a concordância interobservador em lâminas coradas por anticorpos monoclonais de camundongo, anticorpos policlonais e incluímos o novo anticorpo monoclonal de coelho, SP3.

O sistema de score mais empregado e aceito na avaliação das reações IIQ para Her2 é o proposto pelo HercepTest™. Neste sistema os casos 0 e 1+ são considerados negativos enquanto os 2+ e 3+ são considerados positivos fraco (2+) e forte (3+). No entanto, mais recentemente as recomendações para a avaliação do Her2 do Colégio Americano de Patologistas/Sociedade Americana de Oncologia Clínica (29) e a atualização das normas do programa de qualidade do Reino Unido (5), propõem que todos os casos avaliados como 2+ na imunistoquímica devem ser considerados como indeterminados. Estes casos devem ser reavaliados por testes mais específicos, tais como a hibridação *in situ* fluorescente, para definição de tratamento (5, 29). Assim, resolvemos analisar os resultados dos nossos casos avaliados pelos diferentes observadores de três formas, considerando na primeira as categorias em separado, e agrupadas como no HercepTest™, e como sugerido nos

novos guias de recomendações dos Estados Unidos e Reino Unido. Também nestes guias de recomendações, os laboratórios e patologistas que realizam as reações para Her2, devem ter protocolos de reações validados, utilizar procedimentos qualificados, e participar de testes de acreditação, proficiência e competência. Em nosso trabalho empregamos protocolos de reação previamente padronizados e bem estabelecidos em nosso laboratório há dez anos, considerado como controle da fase analítica da reação (7, 8). No presente trabalho procuramos avaliar a variação interobservador na interpretação das reações, que é considerada a fase pós-analítica da reação imunoistoquímica.

A avaliação da superexpressão da proteína Her2 nas lâminas coradas pelos cinco anticorpos mostrou níveis de concordância interobservador satisfatórios ($\kappa=0,596$ a $0,872$). A análise dos resultados em três grupos mostrou melhor concordância quando agrupamos os casos em negativos (0 e 1+) e positivos (2+ e 3+). A maior concordância interobservador ocorreu na análise dos casos fortemente positivos (3+) e totalmente negativos (0). Semelhante ao descrito por outros autores, há maior dificuldade na discriminação das categorias intermediárias (1+ e 2+), justificando a adoção de critérios propostos mais recentemente de se considerar os casos 2+ como indeterminados (10, 25, 27).

A literatura tem ressaltado a importância da experiência com o método para a análise do Her2 (fase pós-analítica). Em nosso estudo, a maior concordância da análise entre observadores ($\kappa= 0,765$ a $0,972$) foi observada entre os analisadores com maior experiência com o método (mais de quatro anos).

Notamos uma concordância maior nas lâminas coradas pelos anticorpos policlonais ($\kappa=0,609$ a $0,872$), com marcação mais forte, devido ao reconhecimento de múltiplos epítomos. O novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 mostrou marcação

intermediária entre os anticorpos policlonais e monoclonais de camundongo ($\kappa=0,641$ a $0,771$), estando de acordo com os relatos dos fabricantes (20) .

CONCLUSÃO

A concordância geral entre os observadores foi considerada entre moderada e muito boa nos cinco anticorpos anti-Her2. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos com marcação fraca (1+) a moderada (2+). A experiência dos observadores influenciou nas taxas de concordância.

REFERÊNCIAS

1. Bankfalvi, A. *et al.* Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, 37(5): 411-9, 2000.
2. Bilous, M. *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*, 16(2): 173-82, 2003.
3. DAKO HercepTest™. A manual for interpretation. Carpinteria, 1999.
4. Dandachi, N.; Dietze, O.; Hauser-Kronberger, C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest*, 82(8): 1007-14, 2002.
5. Ellis, I. O. *et al.* Best Practice No 176: Updated recommendations for HER2 testing in the UK. *J Clin Pathol*, 57(3): 233-7. 2004.
6. Fitzgibbons, P. L. *et al.* Interlaboratory comparison of immunohistochemical testing for HER2: results of the 2004 and 2005 College of American Pathologists HER2 Immunohistochemistry Tissue Microarray Survey. *Arch Pathol Lab Med*, 130(10): 1440-5, 2006.
7. Gouvea, A. P. *et al.* Her-2/neu Immunoreactivity in Invasive Mammary Carcinomas: a Comparative Study Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies Including the Herceptest. *Jornal Brasl Patologia*. 40(1): 47-52, 2004.
8. Gouvea, A. P. *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 14(1): 103-8, 2006.
9. Hanna, W.; Kahn, H. J.; Trudeau, M. Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol*, 12(8): 827-34, 1999.
10. Hoang, M. P. *et al.* HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 113(6): 852-9, 2000.
11. Lacroix-Triki, M. *et al.* High inter-observer agreement in immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer: A multicentre GEFPICS study. *Eur J Cancer*, 42(17): 2946-53, 2006.
12. Landis, J. R.; Koch, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1): 159-74, 1977.

13. Miles, D. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res*, 3(6): 380-4, 2001.
14. Paik, S. *et al.* Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*,94(11): 852-4, 2002.
15. Perez, E. A. *et al.* HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol*, 24(19): 3032-8, 2006.
16. Piccart, M. J.; Di Leo A.; Hamilton, A. HER2. a 'predictive factor' ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer*,36(14): 1755-61, 2000.
17. Press, M. F. *et al.* Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol*, 20(14): 3095-105, 2002.
18. Rocha, R. M. *et al.* Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imunoistoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab*, 42(6): 477-482, 2006.
19. Ross, J. S.; Fletcher, J. A. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 112(1 Suppl 1): S53-67, 1999.
20. Rossi, S. *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*, 124(2): 295-302, 2005.
21. Sales, A. O.; Rodrigues, S. J. P.; Bacchi, C. E. Estudo comparativo entre os métodos LSAB[®]+ e Herceptest[®] para a detecção de HER-2/neu em carcinoma de mama. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, , vol.40, no.4, p.265-271, Ago. 2004
22. Sampatanukul, P. *et al.* A two-phase study model for the standardization of HER2 immunohistochemical assay on invasive ductal carcinoma of the breast. *J Med Assoc Thai*, 88(11): 1680-8, 2005.
23. Schnitt, S.J. Breast cancer in the 21st century: neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol*, 14(3): 213-8, 2001.
24. Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785): 177-82, 1987.
25. Thomson, T. A. *et al.* HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, 14(11): 1079-86, 2001.

26. Tsuda, H. *et al.* Concordance in judgments among c-erbB-2 (HER2/neu) overexpression detected by two immunohistochemical tests and gene amplification detected by Southern blot hybridization in breast carcinoma. *Pathol Int*, 51(1): 26-32, 2001.
27. Tsuda, H. *et al.* Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by HercepTest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma. *Pathol Int*, 52(2): 126-34, 2002.
28. Vincent-Salomon, A. *et al.* Re: HER2 testing in the real world. *J Natl Cancer Inst*, 95(8): 628; author reply 628-9. 2003.
29. Wolff, A. C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2006.

5 - CONCLUSÕES

1. A concordância entre o novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 e os outros anticorpos foi boa, sendo maior para os anticorpos policlonais HercepTest e A0485;
2. A relação entre a superexpressão do Her2 e o CISH mostrou maior sensibilidade para o novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 e para os anticorpos policlonais A0485 e HercepTest. Os anticorpos CB11 e 4D5 mostraram maior especificidade do que os anticorpos SP3, A0485 e HercepTest.
3. A concordância geral entre os observadores foi considerada entre moderada e muito boa na avaliação dos casos corados pelos cinco anticorpos anti-Her2. A menor concordância interobservador ocorreu nos casos com marcação fraca (1+) e moderada (2+). A experiência dos observadores influenciou nas taxas de concordância.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliamos seis diferentes anticorpos no estudo imunoistoquímico da proteína Her2 em carcinomas mamários, incluindo o novo anticorpo monoclonal de coelho SP3 e realizamos hibridação *in situ* cromogênica (CISH) nos mesmos casos, para avaliação da amplificação do gene *HER2*. Realizamos ainda, avaliação da concordância interobservador de uma amostra das reações imunoistoquímicas. Utilizamos uma nova técnica de estudo dos casos, o *tissue microarray* (TMA), na qual conseguimos analisar retrospectivamente grande quantidade de tumores em pequena amostra de tecido, com economia de tempo e material, além da vantagem das lâminas serem processadas ao mesmo tempo, em condições semelhantes, importante para estudos comparativos. Achamos esta técnica relativamente fácil de ser realizada, sem dificuldades na avaliação histológica das lâminas. Verificamos que o anticorpo SP3 mostrou boa concordância com os outros anticorpos, principalmente com os anticorpos policlonais A0485 e HercepTest. Quando comparado ao CISH, o anticorpo SP3 mostrou-se mais sensível do que os anticorpos monoclonais de camundongo (CB11 e 4D5). Estes foram mais específicos do que o SP3, A0485 e HercepTest. Assim, identificamos dois grupos de anticorpos: um grupo mais sensível e outro mais específico, ambos mostrando casos equívocos, falso-positivos e falso-negativos, respectivamente. A escolha de um destes anticorpos é importante e deve ser utilizada com critério e conhecimento da existência de casos equívocos, e cada paciente deve ser estudada individualmente, junto com o quadro clínico e oncológico, na definição de seu tratamento. A concordância interobservador na análise das lâminas coradas pela imunoistoquímica foi considerada de moderada a muito boa, mostrando que existe reprodutibilidade no

estudo imunistoquímico para a avaliação da superexpressão do Her2, e que a experiência do examinador é importante na análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRED, D. C. *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, v.11, n.2, p.155-68, Feb.1998.

ARNOULD, L. *et al.* Agreement between chromogenic in situ hybridisation (CISH) and FISH in the determination of HER2 status in breast cancer. *Br J Cancer*, v.88, n.10, p.1587-91, May 19, 2003.

BANKFALVI, A. *et al.* Comparative methodological analysis of erbB-2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, v.37, n.5, p.411-9, Nov. 2000.

BATTIFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*, v.55, n.2, p.244-8, Aug. 1986.

BENOHR, P. *et al.* Her-2/neu expression in breast cancer--A comparison of different diagnostic methods. *Anticancer Res*, v.25, n.3Bp.1895-900, May-Jun. 2005.

BHARGAVA, R.; LAL P.; CHEN B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification: does it measure up to fluorescence in situ hybridization? *Am J Clin Pathol*, v.123, n.2, p.237-43, Feb. 2005.

BILOUS, M. *et al.* Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines. *Mod Pathol*, v.16, n.2, p.173-82, Feb. 2003.

BILOUS, M. *et al.* Chromogenic in situ hybridisation testing for HER2 gene amplification in breast cancer produces highly reproducible results concordant with fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Pathology*, v.38, n.2, p.120-4, Apr. 2006.

BLOOM, K.; HARRINGTON, D. Enhanced accuracy and reliability of HER-2/neu immunohistochemical scoring using digital microscopy. *Am J Clin Pathol*, v.121, p. 620-30, 2004.

BLOOM, H. J.; RICHARDSON W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, v.11, n.3, p.359-77, Sep. 1957.

BUBENDORF, L. *et al.* Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, v.195, n.1, p.72-9, Sep. 2001.

- CAMP, R. L.; CHARETTE, L. A.; RIMM D.L. *et al.* Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, v.80, n.12, p.1943-9, Dec. 2000.
- CARLSON, R. W. *et al.* HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*, v.4 Suppl 3, p.S1-22; quiz S23-4, Jul. 2006.
- DAKO HercepTest™. A manual for interpretation. Carpinteria, 1999.
- DATTA, M. W. *et al.* A simple inexpensive method for the production of tissue microarrays from needle biopsy specimens: examples with prostate cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.13, n.1, p.96-103, Mar. 2005.
- DE MARZO, A. M.; FEDOR, H. Molecular analysis of tissues using gene expression arrays and tissue microarrays. Short Course #47. United States and Canadian Academy of Pathology, 93rd Annual Meeting, 2004.
- DIAZ, L. K. *et al.* The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem*, v.52, n.4p.501-7, Apr. 2004.
- DOLAN, M.; SNOVER, D. Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice. *Am J Clin Pathol*, v.123, n.5, p.766-70, May. 2005.
- DOWSETT, M. *et al.* Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol*, v.199, n.4, p.418-23, Apr. 2003.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v.19, n.5, p.403-10, Nov. 1991.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histologic grade. In: ELSTON CW & ELLIS IO eds. *Systemic Pathology 3rd Ed.* Vol. 13, 365-84, Churchill-Livinstone. Edinburgh, Scotland, UK. 1998.
- FITZGIBBONS, P. L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*, v.124, n.7, p.966-78, Jul. 2000.
- GOBBI, H. *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with high tumour grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. *Histopathology*, v.36, n.2, p.168-77, Feb. 2000.
- GOFFIN, J. R. *et al.* Impact of germline BRCA1 mutations and overexpression of p53 on prognosis and response to treatment following breast carcinoma: 10-year follow up data. *Cancer*, v.97, n.3, p.527-36, Feb. 1 2003.

GONG, Y.; GILCREASE, M.; SNEIGE, N. Reliability of chromogenic in situ hybridization for detecting HER-2 gene status in breast cancer: comparison with fluorescence in situ hybridization and assessment of interobserver reproducibility. *Mod Pathol*, v.18, n.8, p.1015-21, Aug. 2005.

GOUVÊA, A. *Detecção imuno-histoquímica do HER-2/neu em carcinomas mamários invasivos utilizando diferentes anticorpos e sua relação com a hibridação in situ fluorescente com as características clínicas e outros fatores prognósticos*. 2003. 107f. Tese (Doutorado em Patologia) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOUVEA, A. P. *et al.* Her-2/neu Immunoreactivity in Invasive Mammary Carcinomas: a Comparative Study Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies Including the Herceptest. *Jornal Brasl Patologia*, v.40, n.1, p. 47-52, Jan. 2004.

GOUVEA, A. P. *et al.* Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.14, n.1, p.103-8, Mar. 2006.

GUPTA, D. *et al.* Comparison of fluorescence and chromogenic in situ hybridization for detection of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, v.119, n.3, p.381-7, Mar. 2003.

HAMMOND, M. E. *et al.* Standard reference material for Her2 testing: report of a National Institute of Standards and Technology-sponsored Consensus Workshop. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.11, n.2, p.103-6, Jun. 2003.

HANNA, W.; KAHN, H. J.; TRUDEAU, M. *et al.* Evaluation of HER-2/neu (erbB-2) status in breast cancer: from bench to bedside. *Mod Pathol*, v.12, n.8, p.827-34, Aug. 1999.

HANNA, W. M.; KWOK, K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol*, v.19, n.4, p.481-7, Apr. 2006.

HATANAKA, Y. *et al.* Quantitative immunohistochemical evaluation of HER2/neu expression with HercepTest™ in breast carcinoma by image analysis. *Pathol Int*, v.51, n.1, p.33-6, Jan. 2001.

HENRIKSEN, K. L. *et al.* Semi-quantitative scoring of potentially predictive markers for endocrine treatment of breast cancer: A comparison between whole sections and tissue microarrays. *J Clin Pathol*, 14, Jun. 2006.

HUANG, Z. *et al.* Development of new rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor: immunohistochemical assessment on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.13, n.1, p.91-5, Mar. 2005.

HUANG, Z. *et al.* Development of new rabbit monoclonal antibody to progesterone receptor (Clone SP2): no heat pretreatment but effective for paraffin section immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.14, n.2, p.229-33, Jun. 2006.

INCA BRASIL. www.inca.gov.br.

JACOBS, T. W. *et al.* Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol*, v.17, n.7, p.1974-82, Jul. 1999.

JATOI, I.; MILLER, A. B. Why is breast-cancer mortality declining? *Lancet Oncol*, v.4, n.4, p.251-4, Apr. 2003.

KAY, E. *et al.* Use of tissue microarray for interlaboratory validation of HER2 immunocytochemical and FISH testing. *J Clin Pathol*, v.57, n.11, p.1140-4, Nov. 2004.

KONG, S. Y. *et al.* Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer. *J Clin Pathol*, v.59, n.4, p.373-6, Apr. 2006.

KONONEN, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, v.4, n.7, p.844-7, Jul. 1998.

LAN, C. *et al.* erb-b2 amplification by fluorescence in situ hybridization in breast cancer specimens read as 2+ in immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol*, v.124, n.1, p.97-102, Jul. 2005.

LIN, F.; SHEN, T.; PRICHARD, J. W. Detection of Her-2/neu oncogene in breast carcinoma by chromogenic in situ hybridization in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol*, v.33, n.6, p.376-80, Dec. 2005.

LIU, C. L. *et al.* Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *Am J Pathol*, v.161, n.5, p.1557-65, Nov. 2002.

LOPEZ-GUERRERO, J. A. *et al.* Histological tumor grade correlates with HER2/c-erbB-2 status in invasive breast cancer: a comparative analysis between immunohistochemical (CB11 clone and Herceptest), FISH and differential PCR procedures. *Ark Patol*, v.65, n.1, p.50-5, Jan-Feb. 2003.

LORING, P. *et al.* HER2 positivity in breast carcinoma: a comparison of chromogenic in situ hybridization with fluorescence in situ hybridization in tissue microarrays, with targeted evaluation of intratumoral heterogeneity by in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v.13, n.2, p.194-200, Jun. 2005.

MANLEY, S. *et al.* Relational database structure to manage high-density tissue microarray data and images for pathology studies focusing on clinical outcome: the prostate specialized program of research excellence model. *Am J Pathol*, v.159, n.3, p.837-43, Sep. 2001.

McPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, v.321, p. 624-28, 2000.

MILANES-YEARSLEY, M. *et al.* Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, v.15, n.12, p.1366-73, Dec. 2002.

MILES, D. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. *Breast Cancer Res*, v.3, n.6, p.380-4. 2001.

NISTOR, A. *et al.* Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Pathol*, v.6, n.1 18, p.2, Jan. 2006.

OSBORNE, C. K. *et al.* Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, v.95, n.5, p.353-61, Mar. 5 2003.

PAGE, D. L.; JENSEN, R. A.; SIMPSON, J. F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v.51, n.3, p.195-208. 1998.

PAIK, S. *et al.* Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J Natl Cancer Inst*, v.94, n.11, p.852-4, Jun. 5. 2002.

PENAULT-LLORCA, F.; CAYRE, A. [Assessment of HER2 status in breast cancer]. *Bull Cancer*, v.91 Suppl 4, p.S211-5, Dec 1. 2004.

PICCART, M. J.; DI LEO, A.; HAMILTON, A. HER2. a 'predictive factor' ready to use in the daily management of breast cancer patients? *Eur J Cancer*, v.36, n.14, p.1755-61, Sep. 2000.

PINDER, S. E. *et al.* The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*, v.83, n.8, p.1529-39, Oct 15. 1998.

PRESS, M. F. *et al.* Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*, v.11, n.18, p.6598-607, Sep 15. 2005.

PRITCHARD, K. I. *et al.* HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, v.354, n.20, p.2103-11, May 18. 2006.

RHODES, A. *et al.* Evaluation of HER-2/neu immunohistochemical assay sensitivity and scoring on formalin-fixed and paraffin-processed cell lines and breast tumors: a comparative study involving results from laboratories in 21 countries. *Am J Clin Pathol*, v.118, n.3, p.408-17, Sep. 2002.

ROCHA, R. M. *et al.* Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imunoistoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab*, v.42, n.6, p.477-482, dezembro. 2006.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, v.112, n.1 Suppl 1 p.S53-67, Jul, 1999.

ROSSI, S. *et al.* Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*, v.124, n.2, p.295-302, Aug. 2005.

SAEZ, A. *et al.* HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundred cases. *Breast*, v.15, n.4, p.519-27, Aug. 2006.

SAPINO, A. *et al.* Which breast carcinomas need HER-2/neu gene study after immunohistochemical analysis? Results of combined use of antibodies against different c-erbB2 protein domains. *Histopathology*, v.43, n.4, p.354-62, Oct. 2003.

SAPINO, A. *et al.* Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*, v.449, n.3, p.288-96, Sep. 2006.

SARTELET, H. *et al.* Comparison of liquid based cytology and histology for the evaluation of HER-2 status using immunostaining and CISH in breast carcinoma. *J Clin Pathol*, v.58, n.8, p.864-71, Aug. 2005.

SAUTER, G.; MIRLACHER, M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol*, v.55, n.8, p.575-6, Aug. 2002.

SCHAIRER, C. *et al.* Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, v.96, n.17, p.1311-21, Sep 1. 2004.

SCHNITT, S. J. Breast cancer in the 21st century: neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol*, v.14, n.3, p.213-8, Mar. 2001.

SCHMITT, F. C. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. Manual de imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia, São Paulo, 30-46. 1999.

SEIDAL, T.; BALATON, A. J.; BATTIFORA, H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*, v.25, n.9, p.1204-7, Sep. 2001.

SELVARAJAN, S. *et al.* c-erbB-2 (HER-2/neu) immunohistochemistry in invasive breast cancer: is there concordance between standard sections and tissue microarrays? *Pathology*, v.38, n.4, p.316-20, Aug. 2006.

SLAMON, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, v.235, n.4785, p.177-82, Jan 9. 1987.

STERN, D. F. Tyrosine kinase signalling in breast cancer – ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res*, v.2, p.176-83, 2000.

TANNER, M. *et al.* Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*, v.157, n.5, p.1467-72, Nov. 2000.

TAVASSOLI, F.A., DEVILEE, P. (eds.) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press, Lyon, 2003.

THOMSON, T. A. *et al.* HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*, v.14, n.11, p.1079-86, Nov. 2001.

TROTTER, M. J.; DEMETRICK, D. J.; CIEZAR, S. D. Mapping tissue microarrays: a simplified method for microarray navigation and a data management. Abstract #1440. United States and Canadian Academy of Pathology, 91st Annual Meeting, Chicago IL, 2002.

TSUDA, H. *et al.* Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by HercepTest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma. *Pathol Int*, v.52, n.2, p.126-34, Feb. 2002.

VERONESI, U. *et al.* Breast cancer. *Lancet*, v.365, n.9472, p.1727-41, May 14-20, 2005.

WANG, S. *et al.* Automated cellular imaging system (ACIS)-assisted quantitation of immunohistochemical assay achieves high accuracy in comparison with fluorescence in situ hybridization assay as the standard. *Am J Clin Pathol*, v. 116, p. 495-503, 2001.

WICK, M. R.; SWANSON, P. E. Editorial: Targeted controls in clinical immunohistochemistry; a useful approach to quality assurance. *Am J Clin Pathol*. v.117, p. 7, 2002.

ZHANG, D. *et al.* Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*, v. 16, n. 1, p. 79-84, Jan. 2003.

ZHAO, J. *et al.* Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol*, v.15, n.6, p.657-65, Jun. 2002.

ZYMED. Zymed® Spot-Light® CISH™ Probes and CISH™ Detection. South San Francisco 2005.

Fonte consultada não citada no texto:

SOUZA, M. S. L. Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses. 3.ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2005. 170p.

ANEXOS

ANEXO A - PROTOCOLO PARA IMUNOHISTOQUÍMICA

PROTOCOLO IHQ DA STREPTO-AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE

Padronização adotada pelo Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina/UFMG

Desparafinizar:

- 1- Imergir as lâminas em 1 xilol - 20 min. ⌚
- 2- Imergir as lâminas em álcool absoluto- mergulhar 10X

Bloqueio da peroxidase endógena:

- 1- Imergir as lâminas em solução recém-preparada de peróxido de hidrogênio:
Peróxido de hidrogênio 30% P.A.- 20 ml + Álcool metílico-180 ml por 20 minutos
- 2- Lavar as lâminas em água destilada- mergulhar
- 3- Imergir as lâminas em tampão PBS- 5 minutos

Reativação antigênica:

- 1- Ligar o steamer (panela a vapor) e pré-aqueça por 10 minutos
- 2- Imergir as lâminas em tampão citrato pH=6 pré-aquecido no microondas
- 3- Colocar a cuba com as lâminas no steamer por 25 minutos
- 4- Deixar as lâminas resfriando em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos
- 5- Depois de frias, imergir as lâminas em tampão PBS por 5 minutos

Bloqueio com soro normal de cabra:

- 1- Pingar o soro de cabra nos cortes e incubar em câmara úmida por 20 minutos

Anticorpo primário:

- 1- Escorrer o soro se cabra (não lavar), secar ao redor dos cortes e pingar +/- 50µl do anticorpo primário diluído sobre cada corte,
- 2- Incubar em câmara úmida em temperatura ambiente por 90 minutos.
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisseta e imergi-las em 3 banhos de 5 minutos

Anticorpo secundário:

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar uma gota do anticorpo secundário biotinilado (amarelo) sobre cada corte,
- 2- Incubar em câmara úmida por 20 minutos
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisseta e imergi-las em 3 banhos de 5 minutos

Streptavidina biotina peroxidase:

- 1- Secar ao redor dos cortes e pingar uma gota de streptavidina biotina peroxidase (vermelho) sobre cada corte
- 2- Incubar em câmara úmida por 20 minutos
- 3- Lavar as lâminas uma a uma com o PBS da pisseta e imergi-las 2 banhos de 5 minutos

Revelação da reação:

- 1- Preparar a solução de DAB momentos antes do uso: 1 gota do cromógeno para cada ml de substrato
- 2- Secar ao redor dos cortes e pingar cerca de 50 μ l da solução de DAB até revelar o controle da reação
- 1- À medida que as lâminas são reveladas, coloque-as em um recipiente com água para parar a revelação
- 2- Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos

Contracoloração:

- 1- Mergulhar rapidamente as lâminas na hematoxilina de Harris
- 2- Lavar as lâminas em água corrente por 7 minutos

Desidratação, diafanização e montagem:

- 1- Imergir as lâminas em álcool absoluto- 3 minutos em cada cuba
- 2- Imergir as lâminas em xilol: 10X em cada uma das 2 cubas
- 3- Manter as lâminas na 2ª cuba de xilol enquanto realiza a montagem com lamínula e Enthelan®.

ANEXO B - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS AO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

Apresentações em Congressos e Encontros

Tema livre apresentado como pôster em Encontro de Pós -graduação

Estudo imunoistoquímico comparativo entre o novo anticorpo monoclonal de coelho e anticorpos clássicos para detecção de Her2 e sua correlação com hibridização in situ cromogênica em arrays de tecido de câncer de mama. Nunes CB, Rocha RM, Reis-Filho JS, Rocha GSF, Sanches FSF, Oliveira FN, Gobbi H. I Encontro Nacional de Pós-Graduação em Patologia, São Paulo, 09-11 de Novembro de 2006

Tema livre aceito para apresentação como pôster em Congresso Internacional

Immunohistochemical Comparison between New Rabbit Monoclonal Antibody (SP3) and Classical Antibodies Against HER2: Correlation with Chrommogenic In Situ Hybridization in Breast Câncer Tissue Microarrays. NUNES CB, ROCHA RM, ROCHA GFS, SANCHES FSF, ANDRADE VP, OLIVEIRA FN, HERAS A, GOBBI H. 2007 United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting, San Diego, California, 24 a 30 de Março de 2007.

Artigos completos enviados para publicação em periódicos internacional e nacional indexados ao Index Medicus

The novel rabbit monoclonal antibody against Her2: an immunohistochemical and CISH comparative analysis in breast cancer. NUNES CB, ROCHA RM, REIS-FILHO JS, LAMBROS MB, ROCHA GFS, SANCHES FSF, OLIVEIRA FN, GOBBI H. Submetido à publicação no Histopathology.

Concordância interobservador na interpretação imunoistoquímica da superexpressão do Her2 detectada por cinco diferentes anticorpos em arrays de carcinomas mamários. NUNES CB; ROCHA RM; GOUVÊA AP; TAFURI LSA; MARINHO VFZ; REZENDE MA; GOBBI H.

Submetido à publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

ANEXO C – CARTAS DE SUBMISSÃO DOS ARTIGOS, ACEITE E CERTIFICADO DE RESUMOS CIENTÍFICOS

From: Histopeds@oxon.blackwellpublishing.com
To: cristianabnunes@gmail.com
Cc:
Subject: Histopathology - Manuscript ID HISTOP-12-06-0694
Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Mrs. Cristiana Nunes,

Your manuscript entitled "The novel rabbit monoclonal antibody against Her2: an immunohistochemical and CISH comparative analysis in breast cancer" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Histopathology.

Your manuscript ID is HISTOP-12-06-0694.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/histop> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/histop> .

Thank you for submitting your manuscript to Histopathology.

Yours sincerely,

Mr Justin Gillett
Editorial Assistant
Histopathology

<http://mc.manuscriptcentral.com/histop>

Date Sent: 27-Dec-2006

JBP/ML-AP-2007/261 - Recebimento de Artigo Caixa de entradajbp@sbp.org.br

para mim

[mostrar detalhes](#)

1 Fev (19 horas atrás)

Prezado(a) Dr(a). **Cristiana Buzelin Nunes,**

É com satisfação que recebemos o artigo “CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR NA INTERPRETAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA SUPEREXPRESSION DO HER2 DETECTADA POR CINCO DIFERENTES ANTICORPOS EM ARRAYS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS” aqui cadastrado sob o código AP2007/261.

Informamos que o mesmo será enviado para análise pelo nosso Corpo Editorial, cujo parecer ser-lhe-á enviado tão breve quanto possível.

Atenciosamente,

Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Editor - Patologia JBP

United States and Canadian Academy of Pathology

November 21, 2006

Presenting Author: Helenice Gobbi

Abstract #: 1604

Title: Immunohistochemical Comparison between New Rabbit Monoclonal Antibody (SP3) and Classical Antibodies Against HER2: Correlation with Chromogenic

In Situ Hybridization in Breast Cancer Tissue Microarrays

Poster Session II – Monday Afternoon – Poster #226

Congratulations! The abstract listed above has been accepted for poster presentation during the 2007 USCAP Annual Meeting, March 24–30 in San Diego, CA.

All presenters are required to pay the General Registration Fee for the meeting. You may register online through the USCAP web site –

www.uscap.org – or call the Academy office to request a form (706/733–7550).

Please place the poster on the board with the Poster Number shown above in the poster display area between 12:30 pm – 1:00 pm. Posters are only displayed

for half days. You must remove your poster between 4:30 pm – 5:00 pm (or it may be discarded). Authors should be with their posters during the break period.

EXCITING NEW OPPORTUNITY for 2007 Posters – Call4Posters® and Posters2View™ PROGRAMS

The United States and Canadian Academy of Pathology has arranged with Marathon Multimedia to provide you with the opportunity to create your poster entirely

online using the Call4Posters® service. In addition to this, you have the option to have your poster shipped directly to the meeting for on-site pick-up. This

optional service is an easy and convenient way for you to prepare your poster for the annual meeting! You are not required to use this poster service; however,

we hope you will find it a convenient and simple way to produce a professional poster at a reasonable price. You can access the program through the USCAP

website (www.uscap.org).

Additionally, the USCAP is offering a **FREE** poster upload service for inclusion on a Posters2View™ Online Program. If you choose to electronically submit your

poster (whether or not it was created online), it will be available on the USCAP website for viewing and will remain available after the meeting. This will greatly

increase your poster's exposure and will allow viewers to access your graphs and photos throughout the year. We hope that you will take advantage of this

exciting new opportunity!

Specific Instructions:

1. Poster board surface is 3'10" tall by 5'10" wide. You are limited to this surface.

A header which includes the Title, Authors and Affiliations should be mounted at the top of the board. A copy of the abstract, in large type, should be

posted in the upper left hand corner of the poster board.

2.

All presenters are expected to disclose to the audience any commercial/financial relationship which may have a direct bearing on the subject of the

presentation and which may be perceived as a real or apparent conflict of interest.

3.

All illustrations, charts, graphs, and printed material should be legible from a distance of 3 feet or more. Keep illustrative material simple. Photographs

(including light & electron micrographs) show up better if they are mat finished. Avoid heavy backing material which is difficult to attach to the board.

4.

5. Bring push pins for mounting material on the poster board.

Sincerely,

United States and Canadian Academy of Pathology

Fred G. Silva, M.D., Executive Director

Jeffrey L. Myers, M.D., Education Committee Chairman



I Encontro Nacional de Pós-Graduação em Patologia



Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado "ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO COMPARATIVO ENTRE O NOVO ANTICORPO MONOCLONAL DE COELHO E ANTICORPOS CLÁSSICOS PARA DETECÇÃO DE HER2 E SUA CORRELAÇÃO COM HIBRIDIZAÇÃO IN SITU CROMOGÊNICA EM ARRAYS DE TECIDO DE CÂNCER DE MAMA" foi apresentado sob forma de pôster durante o I ENCONTRO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, realizado em São Paulo/SP nos dias 09 a 11 de novembro de 2006.

Autores: Cristiana Buzelin Nunes, Rocha RM, Reis-Filho JS, Rocha GSF, Sanches FSF, Oliveira FN, Gobbi H

São Paulo, 11 de novembro de 2006.

Dra. Helenice Gobbi

Vice-Presidente Para Assuntos Acadêmicos

Dr. Fernando Augusto Soares

Diretor Científico

Este curso vale 36 créditos para o Programa de Certificação Continuada da SBP (PROCEC-SBP) e 4 pontos para o Programa de Certificação da Comissão Nacional de Acreditação AMB-CFM



FCMSCSP / SANTA CASA SP

ANEXO D – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 510/04

Interesse: Profa. Helenice Gobbi
Depto. de Anatomia Patológica e Medicina Legal
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

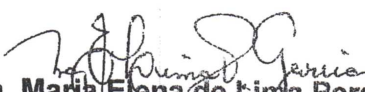
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 09 de fevereiro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Fatores preditivos em câncer de mama: estudo comparativo entre os novos anticorpos monoclonais de coelho e anticorpos clássicos para avaliação de receptores hormonais e Her2/neu usando *tissue microarrays*** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O COEP julga apropriado o uso do material depositado para os fins expostos no projeto do seguinte modo:

a) Amostras depositadas até 1996 (anteriormente à publicação da Res. CNS 196/96) poderão ser utilizadas, sendo bastante para isso a autorização do responsável pelo Serviço, anexa ao processo;

b) Amostras depositadas entre 1997 e 2004 poderão ser utilizadas desde que o doador tenha consentido o uso da amostra para fins científicos, a ser informado pelo Serviço.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG